



Joana Filipa Carreiras Dias

Licenciatura em Ciências de Engenharia Biomédica

**Medições experimentais de ar exalado
em ambiente hospitalar no serviço de
Nefrologia**

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em
Engenharia Biomédica

Orientadora: Prof.^a Doutora Valentina Vassilenko, Prof.
Auxiliar, FCT/UNL

Júri:

Presidente: Dra. Carla Maria Quintão Pereira
Arguente: Dra. Maria Luísa Dias de Carvalho de Sousa Leonardo
Vogal: Dra. Valentina Borissovna Vassilenko



FACULDADE DE
CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA

Dezembro, 2014

Medições experimentais de ar exalado em ambiente hospitalar no serviço de Nefrologia

Copyright © 2014 – Joana Filipa Carreiras Dias, Faculdade de Ciências e Tecnologia e Universidade Nova de Lisboa.

A Faculdade de Ciências e Tecnologia e a Universidade Nova de Lisboa têm o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicar esta dissertação através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, e de a divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objetivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.

Dedicatória e agradecimentos

À minha orientadora, Professora Doutora Valentina Vassilenko, pela orientação precisa, apoio e disponibilidade demonstrados. Agradeço toda a acessibilidade, conselhos e esclarecimentos que se revelaram de enorme valor na elaboração desta dissertação.

À equipa de Nefrologia do Hospital Garcia de Orta pelo apoio prestado, boa vontade e ajuda. Particularmente, agradeço ao Doutor Pedro Bravo pela prontidão, empenho e motivação demonstrados na realização deste estudo.

À equipa da empresa NMT pela prontidão em ajudar sempre que foi necessário. Um especial agradecimento à Helena Ferreira pela ajuda e empenho que sempre demonstrou para comigo e para com este trabalho.

Aos amigos e colegas que lá encontrei, mas também à grande equipa de profissionais que trabalha na Residência Universitária Fraústo da Silva que fizeram com que esta fosse durante 6 anos uma melhor segunda casa para mim.

A todos os meus amigos e colegas, destacando a Ana Mónica Silva, a Carmen Bettencourt, a Sara Santos, a Sofia Olival, o Fábio Vasconcelos, o Francisco Ferreira e o João Aguiar, pelo companheirismo, apoio e motivação sempre demonstrados para comigo, e em particular nesta fase de Mestrado. Estes 6 anos foram mais do que momentos de estudo. Obrigada pela diversão, carinho e compreensão. A todos os colegas e amigos que encontrei no meu percurso académico e que me deram força e incentivo.

Ao João, por todas as palavras, partilha, carinho e amor.

Por fim, quero deixar um enorme agradecimento aos meus pais e irmã. Todas as palavras são poucas para expressar a gratidão que sinto pelos sacrifícios que suportaram, pelo carinho e compreensão, pelas palavras certas e contínuo apoio nesta minha etapa académica.

Resumo

As análises ao ar exalado assumem cada vez uma maior importância como meio de diagnóstico não invasivo. O ar exalado encerra informações acerca do estado metabólico de cada pessoa, em particular, acerca das doenças, nutrição e medicação. Cada vez são em maior número os compostos encontrados na respiração humana com ligação a estados fisiológicos. A matriz respiratória, de carácter mais simples que a matriz sanguínea e urinária, é composta por gases inorgânicos, substâncias não voláteis e compostos orgânicos voláteis (VOCs). As concentrações individuais de cada VOC são na gama das partes por milhão (ppm) a partes por trilhão (ppt), pelo que a sua deteção exige a utilização de uma técnica analítica com elevada sensibilidade.

Este trabalho experimental teve como objetivo principal analisar os compostos orgânicos voláteis em doentes renais. Neste sentido, analisou-se o ar exalado de doentes em hemodiálise, antes e após o tratamento. Realizaram-se, também, análises ao ar exalado de doentes em estádios intermédios da doença renal crónica (DRC3 e DRC4), a fim de verificar a existência de um padrão evolutivo através da análise ao ar exalado. Para tal utilizou-se o BreathSpec®, uma técnica analítica não invasiva e de elevada sensibilidade, cujo princípio físico de funcionamento é a espectrometria de mobilidade iónica acoplada a uma coluna multicapilar (MCC-IMS).

Este trabalho foi realizado em colaboração com a Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa (FCT/UNL), NMT,S.A. e o serviço de Nefrologia do Hospital Garcia de Orta.

Futuramente, pretende-se que esta técnica seja utilizada como meio de diagnóstico precoce da doença renal, bem como, nos casos de pacientes em estágio final da doença, avaliar a eficácia da hemodiálise.

Palavras-chave: VOCs, MCC – IMS, insuficiência renal, nefrologia, ar exalado.

Abstract

Currently, exhaled air analysis assumes an increasing importance as a means of noninvasive diagnosis. Exhaled air contains information about the metabolic state of each person, in particular regarding diseases, nutrition and medication. There are increasingly more compounds found in human breath related to physiological states. The respiratory matrix is simpler than the blood and urine matrix and consists of inorganic gases, non-volatile substances and volatile organic compounds (VOCs). The individual concentrations of each VOC are in the range of parts per million (ppm) to parts per trillion (ppt), so their detection requires the use of an analytical technique with high sensitivity.

This experimental study aimed to analyze the volatile organic compounds in patients with kidney diseases. Accordingly, exhaled air of patients undergoing hemodialysis was analyzed before and after treatment. Exhaled air analysis of patients at intermediate stages of chronic kidney disease (CKD3 and CKD4) was performed in order to verify the existence of an evolutionary pattern. In this sense the BreathSpec® was used as a noninvasive and highly sensitive analytical technique, whose physical principle of operation is the ion mobility spectrometry coupled with a multicapilar column (MCC-IMS).

This study was performed in collaboration with the “*Faculdade de Ciências e Tecnologia - Universidade Nova de Lisboa (FCT/UNL)*”, “*NMT, S.A.*” and the service of nephrology of “*Hospital Garcia de Orta*”.

In the future, it is intended that this technique is used as a means of early diagnosis of renal disease and to evaluate the effectiveness of the hemodialysis program in patients at the end stages of the disease.

Keywords: VOCs, MCC-IMS, renal failure, nephrology, breath analysis.

Índice de Matérias

DEDICATÓRIA E AGRADECIMENTOS.....	V
RESUMO	VII
ABSTRACT	IX
ÍNDICE DE MATÉRIAS	XI
ÍNDICE DE FIGURAS.....	XIII
ÍNDICE DE TABELAS.....	XV
LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS.....	XVII
1. INTRODUÇÃO	1
2. CONCEITOS TEÓRICOS	5
2.1 OS RINS E A SUA FUNÇÃO	5
2.2 PATOLOGIAS RENAIIS	6
2.3 DIÁLISE.....	8
2.4 DIÁLISE EM PORTUGAL	8
2.5 ANÁLISE DO AR EXALADO.....	9
2.6 MONITORAMENTO DA EFICÁCIA DA HEMODIÁLISE ATRAVÉS DO AR EXALADO.....	11
2.7 AMÓNIA	12
3. CONSIDERAÇÕES FÍSICAS E TÉCNICAS.....	13
3.1. PRINCÍPIOS DA ESPETROMETRIA DE MOBILIDADE IÓNICA (IMS)	13
3.2. COMPONENTES E FUNÇÃO DE UM ESPECTRÓMETRO DE MOBILIDADE IÓNICA.....	14
3.3. FONTE DE IONIZAÇÃO E FORMAÇÃO DE IÕES REATIVOS	15
3.3.1. FORMAÇÃO DE IÕES REATIVOS DE POLARIDADE POSITIVA	16
3.3.2. FORMAÇÃO DE IÕES REATIVOS DE POLARIDADE NEGATIVA.....	16
3.4. FORMAÇÃO DE IÕES PRODUTO	17
3.5. MCC – IMS.....	17
3.6. OUTRAS TÉCNICAS	18
4. MATERIAIS E METODOLOGIA	21
4.1. BREATHSPEC®	21
4.2. MOBILIDADE EM MEIO HOSPITALAR.....	25
4.3. MATERIAL	26
4.4. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL	26
4.5. AQUISIÇÃO E TRATAMENTO DE DADOS	30
4.5.1. SOFTWARE LAV	30
4.5.2. SOFTWARE VOCINSPECT	32
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	35
5.1. TRATAMENTO DE DADOS.....	35
5.1.1. ANÁLISE DOS ESPETROS DO GRUPO DE CONTROLO E DO GRUPO DE HEMODIÁLISE.....	35
5.1.2. ANÁLISE DOS ESPETROS DO GRUPO DE DOENTES EM HEMODIÁLISE - RECOLHA ANTES E APÓS O TRATAMENTO	37
5.1.3. ANÁLISE DOS ESPETROS DO GRUPO DE CONTROLO E DO GRUPO EM ESTÁDIO INTERMÉDIO	41
5.2. CÁLCULO DA MOBILIDADE REDUZIDA	43
5.3. VERIFICAÇÃO DO PICO DA AMÓNIA	44
5.4. COMPARAÇÃO ENTRE OS FILTROS.....	50
6. CONCLUSÕES E PERSPETIVAS FUTURAS.....	53
BIBLIOGRAFIA	55
ANEXO I – FOLHA DE REGISTOS.....	59

ANEXO II – CONSENTIMENTO INFORMADO	61
ANEXO III – INFORMAÇÕES ADICIONAIS DOS COLABORADORES DESTE ESTUDO	63
ANEXO IV – POSTER “<i>BREATH ANALYSIS IN NEPHROLOGY</i>”	65
ANEXO V – CERTIFICADO DE PARTICIPAÇÃO NO WORKSHOP “<i>MEDICAL APPLICATION OF IMS TECHNOLOGY FOR HEALTH</i>”	67

Índice de Figuras

FIGURA 2.1 - VISTA ANATÓMICA DO RIM. RETIRADA DE [16].	5
FIGURA 2.2 – EVOLUÇÃO DO NÚMERO DE DOENTES A REALIZAR A PRÁTICA DE DIÁLISE NO INTERVALO DE ANOS DE 2007 A 2012. A: DOENTES EM HEMODIÁLISE. B: DOENTES EM DIÁLISE PERITONEAL [22].	9
FIGURA 3.1 – ILUSTRAÇÃO DE UM ESPECTÓMETRO DE MOBILIDADE IÓNICA. A - FONTE DE IONIZAÇÃO, B - REGIÃO DE IONIZAÇÃO, C – GRELHA DE SEPARAÇÃO DE IÕES; D – REGIÃO DE DERIVA; E – ANEIS DE DERIVA; F- GRELHA DE ABERTURA; G – PRATO DE FARADAY. RETIRADA DE [48].	14
FIGURA 4.1- IMAGEM DO BREATHSPEC. IMAGEM OBTIDA EM LABORATÓRIO.	21
FIGURA 4.2 - RECOLHA DE UMA AMOSTRA DE AR EXALADO. IMAGEM OBTIDA EM LABORATÓRIO.	22
FIGURA 4.3 – ESQUEMA INTERNO DE FUNCIONAMENTO DO BREATHSPEC® [59].	23
FIGURA 4.4 – ESQUEMÁTICO DO FUNCIONAMENTO DA VÁLVULA NA POSIÇÃO A E B DO BREATHSPEC® [59].	24
FIGURA 4.5 – ESTRUTURA DE TRANSPORTE COM A MONTAGEM DO EQUIPAMENTO. IMAGEM TIRADA EM MEIO HOSPITALAR.	25
FIGURA 4.6 - IMAGEM OBTIDA DE UMA ANÁLISE DE AR EXALADO EFETUADA EM LABORATÓRIO, USANDO-SE O SOFTWARE LAV. NA FIGURA SUPERIOR É VISÍVEL A REPRESENTAÇÃO EM MAPA DE CORES, ONDE É APRESENTADO O TEMPO DE DERIVA NO EIXO DOS XX E O TEMPO DE RETENÇÃO NO EIXO DOS YY. NA FIGURA DE BAIXO, ENCONTRA-SE REPRESENTADO O CORRESPONDENTE ESPETRO DE MOBILIDADE.	30
FIGURA 4.7 - JANELA DE VISUALIZAÇÃO DO LAV. (1) LISTAGEM DOS FICHEIROS OBTIDOS E GUARDADOS NUMA MESMA LOCALIZAÇÃO (PASTA). (2) ÁREA DE OBSERVAÇÃO DO(S) ESPETRO(S) SELECIONADO(S), COM POSSIBILIDADE DE DIFERENTES VISUALIZAÇÕES. (3) LISTAGEM DE FICHEIROS PREVIAMENTE SELECIONADOS, COM POSSIBILIDADE DE OS GUARDAR SOB A FORMA DE NOVO PROJETO. IMAGEM OBTIDA EM LABORATÓRIO.	31
FIGURA 4.8 – ECRÁ INICIAL DO SOFTWARE VOCINSPECT. O INÍCIO DA ANÁLISE OCORRE PRESSIONANDO O BOTÃO “START ANALYSIS” QUE DÁ ORIGEM À JANELA “CHOOSE FILES TO ANALYSIS”.	32
FIGURA 4.9 – JANELA DE VISUALIZAÇÃO DO VOCINSPECT ONDE SE APRESENTA UM ESPETRO RESULTANTE DA SUBTRAÇÃO DO AR DA SALA AO AR EXALADO DE UM COLABORADOR. IMAGEM OBTIDA EM LABORATÓRIO.	33
FIGURA 4.10 – IMAGEM OBTIDA ATRAVÉS DO SOFTWARE VOCINSPECT COM REPRESENTAÇÃO NO EIXO VERTICAL DO TEMPO DE RETENÇÃO E NO EIXO HORIZONTAL DO TEMPO DE DERIVA E DO VALOR DE $1/K_0$.	34
FIGURA 5.1 – ESPETROS COM IDENTIFICAÇÃO DO AREASET, ONDE SÃO VISÍVEIS A ACETONA E O ISOPRENO QUE SÃO SUBSTÂNCIAS JÁ CONHECIDAS E QUATRO PICOS DESCONHECIDOS, NUMERADOS DE 1 A 4. A) IMAGEM DO ESPETRO DO AR EXALADO DE UM PARTICIPANTE PERTENCENTE AO GRUPO DE CONTROLO. B) IMAGEM DO ESPETRO DO AR EXALADO DO PACIENTE H12 PERTENCENTE AO GRUPO DE HEMODIÁLISE.	36
FIGURA 5.2 – IMAGEM DO GRÁFICO RESULTANTE DA ANÁLISE PCA. A VERMELHO ENCONTRAM-SE OS DADOS REFERENTES AOS PACIENTES EM HEMODIÁLISE. A VERDE, OS DADOS SÃO RESPEITANTES AOS VALORES PROVENIENTES DOS ESPETROS DO GRUPO DE CONTROLO.	37
FIGURA 5.3 – A) IMAGEM DA SUBTRAÇÃO DO ESPETRO DO AR DA SALA AO ESPETRO DO AR EXALADO DO PACIENTE H07, NO PERÍODO ANTES DE INICIAR O TRATAMENTO DE HEMODIÁLISE, COM DELIMITAÇÃO DA ÁREA DE INTERESSE. B) IMAGEM DA SUBTRAÇÃO DO ESPETRO DO AR DA SALA AO ESPETRO DO AR EXALADO DO PACIENTE H07, NO PERÍODO APÓS TERMINAR O TRATAMENTO DE HEMODIÁLISE, COM DELIMITAÇÃO DA ÁREA DE INTERESSE.	38
FIGURA 5.4 – IMAGEM RESULTANTE DA FIGURA 5.3 PELA APLICAÇÃO DE ZOOM À ZONA DE INTERESSE. A) IMAGEM DA SUBTRAÇÃO DO ESPETRO DO AR DA SALA AO ESPETRO DO AR EXALADO DO PACIENTE H07, NO PERÍODO ANTES DE INICIAR O TRATAMENTO DE HEMODIÁLISE, COM MARCAÇÃO DOS PICOS DE INTERESSE. B) IMAGEM DA SUBTRAÇÃO DO ESPETRO DO AR DA SALA AO ESPETRO DO AR EXALADO DO PACIENTE H07, NO PERÍODO APÓS TERMINAR O TRATAMENTO DE HEMODIÁLISE, COM MARCAÇÃO DOS PICOS DE INTERESSE.	38
FIGURA 5.5 - GRÁFICO DA VARIAÇÃO DE INTENSIDADE DO PICO 1, EM CADA UM DOS ESPETROS DO GRUPO DE PACIENTES EM HEMODIÁLISE, ANTES E APÓS O TRATAMENTO.	40
FIGURA 5.6 - GRÁFICO DA VARIAÇÃO DE INTENSIDADE DO PICO 2, EM CADA UM DOS ESPETROS DO GRUPO DE PACIENTES EM HEMODIÁLISE, ANTES E APÓS O TRATAMENTO.	40
FIGURA 5.7 - GRÁFICO DA VARIAÇÃO DE INTENSIDADE DO PICO DE ACETONA, EM CADA UM DOS ESPETROS DO GRUPO DE PACIENTES EM HEMODIÁLISE, ANTES E APÓS O TRATAMENTO.	41
FIGURA 5.8 – A) IMAGEM DO ESPETRO DO AR EXALADO DE UM PARTICIPANTE DO GRUPO DE CONTROLO, COM MARCAÇÃO DOS PICOS DE INTERESSE. B) IMAGEM DO ESPETRO DO AR EXALADO DO PACIENTE I13 COM INSUFICIÊNCIA RENAL EM ESTÁDIO INTERMÉDIO, COM MARCAÇÃO DOS PICOS DE INTERESSE.	42
FIGURA 5.9 – IMAGEM DO EQUIPAMENTO MCC - IMS NO PROCESSO DE RECOLHA DA AMÓNIA (IMAGEM OBTIDA EM LABORATÓRIO).	45
FIGURA 5.10 – A) IMAGEM DO ESPETRO DE ANÁLISE DO FRASCO VAZIO. B) IMAGEM DO ESPETRO DE ANÁLISE AO FRASCO CONTENDO UMA COMPRESSA ESTERILIZADA.	46

FIGURA 5.11 – IMAGENS DOS ESPETROS DE ANÁLISE DA AMOSTRA DE AMÓNIA PARA AS 5 SOLUÇÕES COM AS DIFERENTES CONCENTRAÇÕES APRESENTADAS NA TABELA 5.2. OS ESPETROS APRESENTADOS ENCONTRAM-SE NUMERADOS DE 1 A 5, TENDO EM CONTA, A SOLUÇÃO DE AMÓNIA QUE DEU ORIGEM AO ESPETRO.	46
FIGURA 5.12 - IMAGENS DOS ESPETROS DE ANÁLISE DA AMOSTRA DE AMÓNIA EMBEBIDA NUMA COMPRESSA PARA AS 5 SOLUÇÕES COM AS DIFERENTES CONCENTRAÇÕES APRESENTADAS NA TABELA 5.2. OS ESPETROS APRESENTADOS ENCONTRAM-SE NUMERADOS DE 1 A 5 CONSOANTE A SOLUÇÃO DE AMÓNIA QUE DEU ORIGEM AO ESPETRO.	47
FIGURA 5.13 – A) IMAGEM DA SUBTRAÇÃO DO ESPETRO DO FRASCO VAZIO COM COMPRESSA AO ESPETRO RESULTANTE DA ANÁLISE DA AMOSTRA 3 DE AMÓNIA EMBEBIDA NUMA COMPRESSA. B) IMAGEM DA SUBTRAÇÃO DO ESPETRO DO FRASCO VAZIO COM COMPRESSA AO ESPETRO RESULTANTE DA ANÁLISE DA AMOSTRA 4 DE AMÓNIA EMBEBIDA NUMA COMPRESSA.....	48
FIGURA 5.14 – A) IMAGEM DA SUBTRAÇÃO DO ESPETRO DO FRASCO VAZIO AO ESPETRO RESULTANTE DA ANÁLISE DA AMOSTRA 3 DE AMÓNIA. B) IMAGEM DA SUBTRAÇÃO DO ESPETRO DO FRASCO VAZIO AO ESPETRO RESULTANTE DA ANÁLISE DA AMOSTRA 4 DE AMÓNIA.	48
FIGURA 5.15 – A) IMAGEM DO ESPETRO DA ANÁLISE DA AMOSTRA 3 DE AMÓNIA, RECORRENDO AO <i>SOFTWARE</i> LAV. A VERMELHO É DELIMITADO O PICO CORRESPONDENTE A ESTA SUBSTÂNCIA. B) IMAGEM RESULTANTE DA SUBTRAÇÃO DO ESPETRO DO FRASCO VAZIO AO ESPETRO RESULTANTE DA ANÁLISE DA AMOSTRA 4 DE AMÓNIA, RECORRENDO AO <i>SOFTWARE</i> VOCINSPECT. A VERMELHO É DELIMITADO O PICO CORRESPONDENTE A ESTA SUBSTÂNCIA.....	49
FIGURA 5.16 – 1) IMAGEM DO ESPETRO DO AR EXALADO DE UM COLABORADOR ONDE NÃO FOI USADO FILTRO. A VERMELHO ENCONTRA-SE DELIMITADO O PICO DO ISOPRENO (1) E O DA ACETONA (2). 2) IMAGEM DO ESPETRO DO AR EXALADO DE UM COLABORADOR EM QUE NA RECOLHA FOI USADO UM FILTRO <i>BIOPAC</i> . 3) IMAGEM DO ESPETRO DO AR EXALADO DE UM COLABORADOR EM QUE NA RECOLHA FOI USADO UM FILTRO DA MARCA <i>INTERSURGICAL</i>	50
FIGURA 5.17 - GRÁFICO COM OS VALORES DE INTENSIDADE DA ACETONA E ISOPENO, PARA CADA UM DOS DIFERENTES TIPOS DE FILTROS (SEM FILTRO, FILTRO <i>BIOPAC</i> E FILTRO <i>INTERSURGICAL</i>).....	51

Índice de Tabelas

TABELA 2.1 – ESTÁDIOS DE PROGRESSÃO DA DOENÇA CRÓNICA RENAL. ADAPTADA DE [20].....	7
TABELA 2.2 – TABELA QUE CONTÉM OS PRINCIPAIS VOCs E A PATOLOGIA À QUAL ESTÃO ASSOCIADOS.....	10
TABELA 3.1 – VANTAGENS E DESVANTAGENS DE ALGUMAS DAS TÉCNICAS ANALÍTICAS MAIS COMUNS PARA ANÁLISE DE VOCs.	20
TABELA 4.1 – ESPECIFICAÇÕES TÉCNICAS DO ESPIRÓMETRO USADO PARA LIGAÇÃO AO EQUIPAMENTO BREATHSPEC®.	22
TABELA 4.2 – ALGUNS ASPETOS TÉCNICOS DO EQUIPAMENTO BREATHSPEC® [59].	25
TABELA 4.3 – SÍNTESE DO MATERIAL UTILIZADO NA RECOLHA DAS ANÁLISES.....	26
TABELA 4.4 – TABELA COM OS DADOS DOS PACIENTES EM TRATAMENTO DE HEMODIÁLISE.	28
TABELA 4.5 – TABELA COM OS DADOS DOS PACIENTE EM ESTÁDIO INTERMÉDIO DA DOENÇA (DRC3 E DRC4).....	28
TABELA 4.6 – PROGRAMA DE ANÁLISE BREATH_5M IMPLEMENTADO NO BREATHSPEC® DEFINIDO PARA OS PROCEDIMENTOS DE RECOLHA DO AR EXALADO.....	29
TABELA 5.1 - MOBILIDADE IÓNICA REDUZIDA (K_0) PARA OS PICOS 1 E 2 DETETADOS, BEM COMO O TEMPO DE DERIVA (T_D) E DE RETENÇÃO (T_R).	44
TABELA 5.2 – CONCENTRAÇÕES DE AMÓNIA ANALISADAS.....	44
TABELA 5.3 – PROGRAMA BREATH_5M IMPLEMENTADO NO MCC - IMS DEFINIDO PARA OS PROCEDIMENTOS DE ANÁLISE DAS AMOSTRAS DE AMÓNIA.	45
TABELA 5.4 – MOBILIDADE IÓNICA REDUZIDA (K_0) PARA O PICO DE AMÓNIA, BEM COMO O TEMPO DE DERIVA (T_D) E DE RETENÇÃO (T_R).	49
TABELA 0.1 – INFORMAÇÕES CLÍNICAS REFERENTES AOS DOENTES EM HEMODIÁLISE.....	63
TABELA 0.2 - INFORMAÇÕES CLÍNICAS REFERENTES AOS DOENTES EM ESTÁDIOS INTERMÉDIOS DA DOENÇA RENAL CRÓNICA..	64

Lista de Siglas e Abreviaturas

BUN	Blood urea nitrogen
F	Feminino
GC	Cromatografia gasosa
GC-MS	Espetrometria de massa com cromatografia gasosa
IMS	Espetrometria de Mobilidade Iónica
IRA	Insuficiência renal aguda
IRC	Insuficiência renal crónica
LAV	Software de análise
M	Masculino
MCC	Coluna multicapilar
MCC-IMS	Espetrometria de mobilidade iónica acoplada a uma coluna multicapilar
MS	Espetrometria de massa
NIH	National Institutes of Health
PCA	Análise de Componentes Principais
ppb	Partes por bilião (ng/mL)
ppm	Partes por milhão (µg/mL)
ppt	Partes por trilião (pg/mL)
PTR-MS	Espetrometria de massa por reação de transferência de protões
RIP	Pico de iões reativos
SPN	Sociedade Portuguesa de Nefrologia
SCS	Sector Convencionado da Saúde
SIFT-MS	Espetrometria de massa associada a um tubo de deriva de seleção de iões
TMA	Trimetilamina
TFG	Taxa de filtração glomerular
VOCs	Compostos orgânicos voláteis

1 ■ Introdução

Nos últimos tempos, os avanços no campo da medicina têm sido inúmeros, sendo visíveis no aperfeiçoamento de técnicas, nos materiais utilizados, nos recursos disponíveis. Estes avanços refletem-se na esperança média de vida, que é hoje muito superior à verificada poucos anos atrás [1]. Esta tentativa de melhorar a condição humana não cessará, havendo um aumento de técnicas que possibilitem uma melhoria da qualidade de vida. Neste sentido, a melhoria pode passar por uma deteção precoce de patologias. À deteção precoce está associada, regra geral, um aumento da probabilidade de sobrevivência a certa patologia. Deste modo, é de importância extrema desenvolver métodos que permitam a deteção precoce de doenças, sendo, ainda mais benéfica a deteção daquelas cuja incidência se faça sentir em grande escala.

A insuficiência renal tem uma incidência estimada em 8 – 16% da população mundial [2], afetando mais de 10% de europeus [3,4]. O estudo *Global Burden of Disease* (2010), demonstra que a incidência da doença está em crescimento, apresentando a doença posicionada em 27º lugar no que respeita à taxa de mortalidade, em 1990, mas subindo para o 18º lugar em 2010. Este aumento da taxa de mortalidade é preocupante e faz-se acompanhar de um aumento da incidência e prevalência em estádios avançados e irreversíveis da doença [2]. No estágio final da doença é necessário o recurso a diálise ou transplante, implicando elevados consumos de tempo, dinheiro e de recursos de saúde [3].

A demografia associada a pessoas com insuficiência renal é de grande amplitude em todo o mundo, existindo uma ampla variação na média de idades dos doentes que sofrem da doença, quer se considere o estágio final ou um mais intermédio [2].

A insuficiência renal crónica é caracterizada por 5 estádios de progressão que têm por base a capacidade de filtrar do rim [5]. Esta classificação foi introduzida em 2002 pela *National Kidney Foundation* [5,6] sendo, que no primeiro estágio, o nível de função renal encontra-se pouco afetado, contrariamente ao verificado no estágio 5 onde ocorre falência renal. Estes estádios são determinados tendo por base a presença de afeções renais e a taxa de filtração glomerular (TFG), que é uma medida do nível da função renal [5].

Em Portugal, estima-se que cerca de 800 mil portugueses sofram desta doença. Dados do Registo da Sociedade Portuguesa de Nefrologia (SPN) revelam que existiam em 2011, no estágio 5, cerca de 17000 doentes em tratamento de substituição da função renal. Destes, cerca de 11000 encontravam-se a realizar diálise e cerca de 7000 eram transplantados renais [4]. Todos os anos surgem mais de dois mil novos casos de doentes com insuficiência renal crónica terminal [7]. A doença apresenta uma progressão silenciosa e com poucos sintomas iniciais, o que leva a uma despreocupação geral dos cuidados a ter com a saúde renal, sendo

sentido o agravamento dos sintomas em fases mais avançadas da mesma [7,8]. Uma identificação precoce da insuficiência renal desacelera a sua progressão e reduz o risco de morbilidade e mortalidade cardiovascular [2]. A sintomatologia tardia da doença reflete, novamente, a necessidade de existência de um método de deteção precoce da mesma. A prevenção da doença crónica renal e das suas complicações pode fazer-se por meio da consciencialização e do uso de métodos precisos para o diagnóstico em tempo útil [2].

Num caso de falência renal, o doente tem de realizar tratamento de diálise. Em Portugal, o “preço compreensivo” é, desde Agosto de 2011, de 470,09 € por doente e por semana [9]. Este valor é superior nas regiões de saúde de Lisboa e Vale do Tejo e Norte, uma vez que existe um número mais elevado de doentes em tratamento. No total, em 2010, os encargos com a hemodiálise representaram 33% dos encargos do Sector Convencionado da Saúde (SCS) [10].

Convencionalmente, a deteção da doença é feita com recurso a exames simples de proteína na urina ou realizando um exame de sangue para medir o nível de creatinina, para posterior cálculo da TFG, como referido anteriormente [5]. De forma mais genérica, a medicina moderna é baseada na análise de sangue, de urina, do fluido e tecido corporal como meios auxiliares de identificação de patologias. Recentemente, tem surgido como ferramenta adicional de diagnóstico a análise do ar exalado, útil na identificação de compostos voláteis. As análises ao ar exalado apresentam grandes vantagens uma vez que se tratam de recolhas não-invasivas e de amostra de fácil obtenção. A presença de gases ou metabolitos voláteis no ar exalado tem sido associada a diversas patologias, como é o caso das doenças renais [11].

Existem inúmeras técnicas que permitem a análise do ar exalado, entre as quais se destaca a técnica de espectrometria de mobilidade iónica (IMS). Desde as primeiras aplicações analíticas desta técnica decorreram já, aproximadamente, 100 anos, tendo sido amplamente utilizada na deteção de agentes de guerra química, de drogas, explosivos, poluentes ambientais bem como para aplicações no âmbito de monitoramento do trabalho [12]. A elevada sensibilidade deste método, aliada à rapidez e ao baixo custo de análise, tornam a técnica atrativa para aplicação noutras áreas, como é o caso da medicina. Quando combinada com uma coluna multicapilar (MCC-IMS), obtêm-se melhores informações de misturas complexas em análise e anulam-se possíveis efeitos negativos da humidade [13].

Neste sentido, o presente trabalho assume como objetivo principal dar um contributo para o diagnóstico precoce da insuficiência renal, mais concretamente estabelecer um conjunto de compostos característicos das doenças renais e que podem ser identificados numa análise ao ar exalado. Pretende-se, igualmente, estudar a possível monitorização da eficácia do tratamento de hemodiálise através das análises ao ar exalado. Este trabalho surge na sequência de um estudo do tipo prova de conceito realizado por Ricardo Alves, aquando da realização da dissertação de mestrado, nesta mesma instituição (2012). Tal como anteriormente aconteceu, o trabalho foi realizado em colaboração com a empresa NMT – Tecnologia, Inovação e Consultadoria, SA e com o Hospital Garcia de Orta. A recolha das amostras teve lugar no serviço de Nefrologia do Hospital Garcia de Orta, utilizando-se o equipamento BreathSpec®.

No decurso deste estudo foi realizado um *workshop* teórico-prático denominado: “*Medical application of IMS technology for Health*”. Foi também submetido um *poster* para o *Breath Analysis Summit 2013*, intitulado “*Breath Analysis in Nephrology*”.

O trabalho encontra-se estruturado em 6 capítulos. No capítulo 2 é feita uma pequena introdução teórica às análises ao ar exalado, sendo abordada a sua utilização como meio de diagnóstico médico e respetivas vantagens. Ainda neste capítulo, é feita uma descrição da morfologia renal, abordando as patologias associadas ao sistema urinário bem como o tratamento por hemodiálise, destacando o panorama de Portugal no que se refere ao assunto. No capítulo 3 é feita uma abordagem geral à técnica de espetrometria de mobilidade iónica, apresentando os aspetos descritivos do princípio de funcionamento, características e conceitos teóricos subjacentes à mesma. A descrição dos materiais usados e da metodologia de aquisição dos dados é apresentada no capítulo 4. No capítulo 5 apresentam-se os resultados obtidos, sendo realizada uma análise estatística e comparativa dos mesmos, com o intuito de interpretar e relacionar as situações encontradas. Por último, no capítulo 6 expõem-se as conclusões finais e ainda propostas de melhoramento do trabalho realizado bem como perspectivas futuras para a continuação do estudo.

2. ■ Conceitos Teóricos

No processo de metabolização dos nutrientes, pelas células do corpo, produzem-se resíduos como dióxido de carbono e água. O catabolismo das proteínas produz impurezas nitrogenadas tóxicas, como a ureia e a amónia. Para além destas impurezas, no nosso corpo ocorre ainda uma acumulação em excesso de iões essenciais. Estes materiais tóxicos e os materiais essenciais em excesso têm de ser eliminados a fim de se manter a homeostase. Neste sentido, o sistema urinário apresenta como principal função auxiliar na homeostase, controlando a composição e o volume do sangue, através da remoção e introdução de quantidades de água e solutos [14]. Do sistema fazem parte dois rins, dois ureteres que fazem o transporte da urina dos rins para a bexiga, uma bexiga urinária e uma uretra que transporta a urina da bexiga para o exterior do corpo [14,15].

2.1 Os rins e a sua função

A figura 2.1 mostra um diagrama da anatomia de um rim.

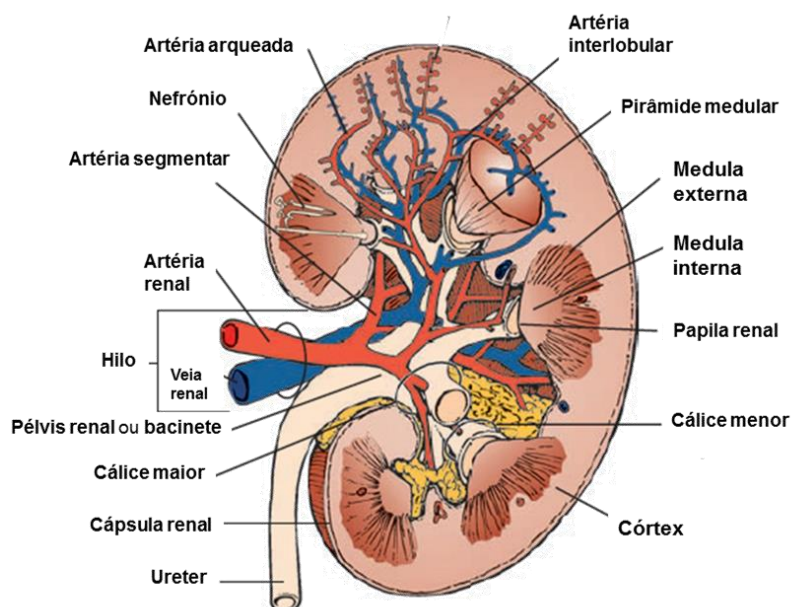


Figura 2.1 - Vista anatómica do rim. Retirada de [16].

Os rins são órgãos pares responsáveis pela execução de várias funções. Estes são uma parte essencial do sistema urinário, participando em muitas funções homeostáticas [16].

Os rins apresentam um contorno visualmente semelhante a feijões com uma dimensão semelhante a uma mão fechada, apresentando cerca de 10 cm de comprimento, 5 cm de largura e 4 cm de espessura [17]. Num adulto, o peso de cada rim é de cerca de 150 g. Embora possuam um tamanho relativamente pequeno, estes recebem cerca de 20% do débito cardíaco [16] [17]. Relativamente à sua constituição, o rim encontra-se dividido em duas regiões: uma parte externa designada por córtex e uma parte interna designada de medula. O córtex, tipicamente de coloração castanho avermelhado, apresenta aparência granulada. A medula possui cor clara e tem uma aparência estriada [16].

A unidade histológica e funcional básica do rim é o nefrónio, havendo em cada rim cerca de um milhão de nefrónios, medindo a maioria destes cerca de 50-55 mm [15] [16] [18]. Cada nefrónio encontra-se dividido em dois componentes principais: o corpúsculo renal, onde o plasma sanguíneo é filtrado, e o túbulo renal, no qual o filtrado passa. O corpúsculo renal é uma rede de capilares, o glomérulo, que se encontra rodeado pela Cápsula de *Bowman*. O túbulo renal encontra-se segmentado, fazendo parte deste o tubo contornado proximal, a ansa de *Henle* e o tubo contornado distal [14] [15] [16]. Os nefrónios, relativamente à posição ocupada, são designados de justamedulares ou corticais. Os justamedulares apenas representam 15% da totalidade dos nefrónios e têm os corpúsculos renais localizados juntos à medula, apresentando ansas de *Henle* bastante profundas que perfuram a mesma. Os corticais não apresentam uma ansa de *Henle* que perfure a zona medular, sendo esta a principal característica diferenciadora entre ambos [15].

2.2 Patologias Renais

As alterações nos vasos sanguíneos renais, com redução do débito renal, levam a uma constante diminuição do tamanho dos rins. Estas alterações têm início por volta dos 20 anos, perdurando para o resto da vida. A quantidade de sangue que circula nos rins diminui, a partir desta idade, cerca de 10% a cada 10 anos. Verifica-se uma diminuição das capacidades de secreção e absorção e consequentemente nefrónios inteiros deixam de funcionar. A função renal fica debilitada e a capacidade de eliminação do sangue relativa ao ácido úrico, à ureia, à creatinina e às toxinas fica comprometida. As alterações renais relacionadas com o envelhecimento provocam diminuições na capacidade de reserva do rim, levando a que doenças como diabetes ou hipertensão arterial produzam mais efeitos adversos nos rins dos idosos [15].

Os sinais e sintomas relacionados com a doença renal e urinária são diversos e, por vezes, pouco específicos [18]. Os danos renais podem resultar de infeções, alergias, defeitos congénitos, pedras nos rins, tumores [19] que, por sua vez, resultam em doenças, destacando-se, para o presente estudo, a Insuficiência Renal [15].

A gravidade da insuficiência renal é avaliada por estádios. Em 2002, a *National Kidney Foundation* dividiu a progressão da doença em 5 estádios, como se pode ver na tabela 2.1. Esta separação dos estádios é determinado pelo valor da taxa de filtração glomerular (TFG ou

GFR, do inglês *Glomerular Filtration Rate*) [5,20]. O cálculo do valor da TFG tem em conta a concentração da creatinina e algumas variáveis como idade, sexo, peso corporal e raça [20]. Uma característica da doença prende-se com a fraca sintomatologia mesmo num estágio moderadamente grave, levando a que o doente procure ajuda médica já num estado de progressão bastante elevado [18].

Tabela 2.1 – Estádios de progressão da doença crónica renal. Adaptada de [20].

Estádios	Descrição	TFG (ml/min/1,73 m ²)
1	Lesão renal com TFG normal	≥90
2	Lesão renal com leve redução da TFG	60-89
3	Redução moderada da TFG	30-59
4	Redução grave da TFG	15-29
5	Falência renal	<15 ou diálise

A insuficiência renal aguda (IRA) caracteriza-se por uma rápida deterioração da função renal, durante um curto período de tempo (horas ou dias). Esta patologia é, normalmente, acompanhada de oligúria/anúria (passagem de urina diária inferior a 500 ml), no entanto, o melhor indicador é o rápido decréscimo na taxa de filtração glomerular, levando à retenção do nitrogénio. A IRA pode ter reincidências, podendo assim ser indicativa de um estado pré-existente de insuficiência renal crónica estável. De notar que é vital distinguir entre estas duas possibilidades de diagnóstico [18].

A insuficiência renal crónica (IRC) pode resultar de qualquer causa de doença do parênquima renal [18], fazendo acompanhar-se de uma diminuição progressiva e, frequentemente irreversível na taxa de filtração glomerular [15]. A TFG num adulto normal é de cerca de 125 ml/min, sendo esta a quantidade de filtrado que se forma em ambos os rins a cada minuto. É importante que este valor se mantenha constante de forma a manter a homeostase da filtração glomerular. Um aumento no valor da TFG indica uma passagem rápida de substâncias através dos nefrónios, não ocorrendo reabsorção, sendo expelidas como parte da urina. Contrariamente, se a TFG apresenta um valor muito baixo, o filtrado é reabsorvido quase na totalidade, não estando os rins a exercer o seu papel de eliminação de resíduos corretamente [14].

A maioria dos sinais e sintomas de insuficiência renal podem ser aliviados recorrendo-se à diálise. Existem dois métodos de diálise amplamente utilizados para tratar pacientes com falência renal irreversível (estádio 5), sendo eles a diálise peritoneal e a hemodiálise [16].

2.3 Diálise

Na presença de insuficiência renal terminal os rins encontram-se debilitados, estando privados da sua capacidade de excreção de impurezas, e de regulação do pH, bem como da regulação de eletrólitos e água no plasma, devendo, o sangue, ser filtrado por meios artificiais [14]. A diálise baseia-se na colocação de um volume artificial elevado de fluido (dialisado) em estreita proximidade com um elevado volume de sangue do paciente, verificando-se separação entre os dois devido à colocação de uma membrana semipermeável [18].

Como já foi dito anteriormente, as funções de excreção desempenhadas pelos rins podem ser executadas artificialmente recorrendo-se à hemodiálise ou à diálise peritoneal [14,15].

Na hemodiálise, o princípio de funcionamento baseia-se em fazer circular o sangue por tubos constituídos por membranas seletivamente permeáveis [14,15]. Estes tubos encontram-se rodeados por um líquido que apresenta uma concentração de solutos semelhante ao plasma, excetuando-se os produtos da degradação metabólica. Desta forma, origina-se um gradiente de difusão para estes produtos entre o sangue e o líquido de diálise, denominado dialisante. Os poros de reduzida dimensão da membrana da diálise impossibilitam a passagem de proteínas plasmáticas e, uma vez que, o dialisante contém os mesmos solutos úteis que o plasma, o movimento destas substâncias é nulo [15]. O dialisado é substituído continuamente a fim de manter os gradientes de concentrações favoráveis entre a solução e o sangue [14]. O dialisante não contém produtos da degradação metabólica, levando a uma rápida difusão destes do sangue para o dialisante. Normalmente o sangue é retirado do organismo através de uma artéria, e reentra no mesmo por uma veia [15]. Ao remover as impurezas do sangue, a membrana de diálise realiza umas das principais funções dos rins, havendo necessidade de se realizar este procedimento, em média, três vezes por semana [14,18].

Na diálise peritoneal, o dialisado é introduzido através de um tubo flexível dentro da cavidade peritoneal, e o próprio peritoneu atua como uma membrana semipermeável. Quando ocorre o equilíbrio químico, verifica-se a substituição do dialisado por fluido novo. A principal vantagem desta técnica reside na possibilidade do doente a poder realizar em casa, evitando a deslocação a um centro de hemodiálise [18], três vezes por semana, sem necessidade de ficar ligado a uma máquina para purificar o sangue [7].

2.4 Diálise em Portugal

Portugal apresenta uma das taxas mais elevadas de doentes renais do mundo [8], estimando-se que cerca de 14 mil pessoas sofram de insuficiência renal crónica, havendo cerca de 10 mil doentes a realizar a prática de diálise [21].

No ano de 2012, verificou-se um abrandamento da incidência global de insuficiência renal crónica em doentes no estágio 5 e que iniciaram o tratamento de substituição renal, quando comparando com anos precedentes. No entanto, confirma-se um aumento na prevalência da doença, de forma mais acentuada na diálise peritoneal [22].

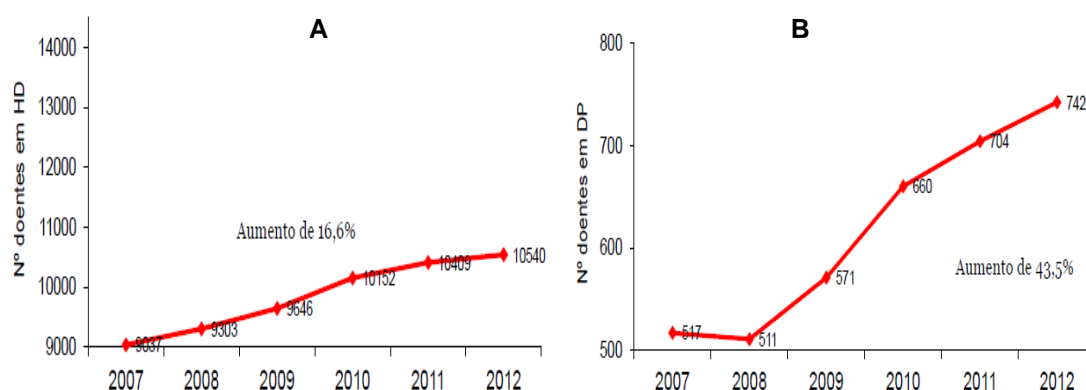


Figura 2.2 – Evolução do número de doentes a realizar a prática de diálise no intervalo de anos de 2007 a 2012. A: Doentes em Hemodiálise. B: Doentes em Diálise Peritoneal [22].

Em Portugal, um doente em hemodiálise custa entre 450 e 470 euros por semana ao Estado, perfazendo, num mês uma média de 1900 euros. Num ano, a fatura total gasta nesta área ascende os 290 milhões de euros [23,21].

2.5 Análise do ar exalado

O reconhecimento das potencialidades das análises ao ar exalado como meio de diagnóstico deu-se há já muitos séculos, mas a primeira publicação de uma análise quantitativa só ocorreu em 1784 quando Lavoisier analisou dióxido de carbono na respiração [24,25]. As análises modernas ao ar exalado iniciaram-se em 1970 com a descoberta de 200 compostos diferentes presentes na respiração, utilizando-se a técnica de cromatografia gasosa [26].

As análises ao ar exalado têm atraído um aumento de interesse como meio de diagnóstico não invasivo [11,24,27,28]. Outras características como a fácil obtenção da amostra bem como a possibilidade de monitoramento frequente são atributos que conferem vantagem à técnica [11,29,28].

O ar exalado encerra informações acerca do estado metabólico, destacando-se informações sobre doenças, medicação, nutrição, higiene oral [13]. Os compostos encontrados na respiração humana com ligação a estados fisiológicos surgem cada vez em maior número. Destes compostos destacam-se a acetona, fortemente ligada à patologia de diabetes [24,29], e a amónia que está relacionada com disfunções a nível do fígado e/ou rins [24]. Para além destes, a composição do ar exalado já revelou conter informações importantes para pacientes com asma, insuficiência renal e hepática, cancro pulmonar, doença pulmonar obstrutiva crónica ou distúrbios metabólicos. Também o estado de stress oxidativo pode ser alvo de análise através da monitorização dos produtos voláteis, provenientes da peroxidação lipídica, presentes no ar exalado [28]. Na tabela 2.2 são apresentados alguns dos principais compostos

orgânicos voláteis (frequentemente designados como VOCs, do inglês *volatile organic compounds*) com a respetiva patologia à qual se associam.

Tabela 2.2 – Tabela que contém os principais VOCs e a patologia à qual estão associados.

VOCs	Patologia	Ref.
Etano e pentano	Peroxidação lipídica	[30], [31], [32]
Isopreno	Metabolismo do colesterol	[31], [33], [32]
Acetona	Diabetes	[30], [31], [34], [33]
Hidrocarbonetos metilados	Cancro do pulmão ou fígado	[31]
Óxido Nítrico	Doenças pulmonares (asma, doença pulmonar obstrutiva crónica, fibrose cística)	[30], [32]
Compostos com enxofre	Insuficiência hepática	[31], [32]
Compostos com azoto (amónia, dimetilamina, trimetilamina)	Insuficiência renal ou Insuficiência hepática	[35], [24], [31], [32], [36]

A matriz respiratória é altamente complexa, contendo gases inorgânicos (por exemplo, NO e CO₂), algumas substâncias não voláteis e compostos orgânicos voláteis (por exemplo, isopreno e acetona) [29]. No que se refere aos VOCs foi verificada a existência de mais de 1000 traços destes compostos [24,26]. Apesar da complexidade da matriz respiratória, se comparada a outras matrizes biológicas, como o sangue e urina, esta é de carácter mais simples [37,29]. Em média, na respiração exalada humana estão presentes 78,6% de azoto, 16% de oxigénio, 4,5% de dióxido de carbono e 0,9% são gases inertes e VOCs [24]. No que respeita os 0,9% de ar que representa os gases inertes e os VOCs, as concentrações de gases individuais são na gama das partes por milhão (ppm) a partes por trilião (ppt) [11,24]. Os VOCs podem ter origem endógena ou exógena, pelo que uma análise detalhada destes compostos pode fornecer um perfil respiratório do estado fisiológico [11,38,29]. Este perfil respiratório pode ser usado para obter informações sobre o estado de saúde atual, tendo potencial de prever resultados futuros [29,25].

As análises ao ar exalado são baseadas no equilíbrio entre o ar alveolar e o sangue que circula na rede de capilares pulmonares. Os compostos presentes no ar exalado são proporcionais às suas concentrações no sangue devido à rápida troca gasosa ocorrida nos pulmões, e quais são por vezes difíceis de detetar diretamente em amostras sanguíneas [37,29]. A eliminação de substâncias tóxicas pelos pulmões ocorre por difusão simples e, geralmente, é inversamente proporcional à sua absorção [37].

O ar exalado não é homogéneo, sendo, para indivíduos saudáveis, constituído por ar do “espaço morto” (150 mL) e por ar alveolar (350 mL). O ar do espaço morto é proveniente da traqueia e brônquios, não efetuando trocas gasosas, contrariamente ao ar alveolar que provém

dos pulmões e participa em trocas gasosas com o sangue [39,40,41]. Numa análise de ar exalado apenas o ar alveolar tem informação de interesse, pelo que apenas é recolhida a parte final da expiração [37,39].

Ainda que com inúmeras vantagens, as análises ao ar exalado apresentam como inconveniente o facto de não existirem métodos analíticos padronizados o que conduz a uma certa variabilidade na quantificação dos compostos [29].

Contudo, melhorias nesta área têm vindo a ser feitas e se, no passado, os métodos analíticos usados para o estudo do ar exalado eram limitativos na medida em que era necessária pré-concentração da amostra, resultando num tempo de análise bastante demorado e em despesas de preparação da amostra elevadas [13], os avanços recentes nesta área têm resultado em melhorias no que respeita aos equipamentos e à recolha de amostra referentes a este tipo de análise.

2.6 Monitoramento da eficácia da hemodiálise através do ar exalado

A hemodiálise, embora sendo um tratamento absolutamente necessário para quem sofreu falência renal, não consegue substituir totalmente a função renal nativa. Verifica-se um aumento de mortalidade de quem faz este tratamento, por comparação a indivíduos que não sofram da doença e que estejam na mesma faixa etária. Os valores de mortalidade verificados poderiam ser menores com um melhor ajuste individual do tempo de tratamento. A quantidade/tempo de diálise é estabelecida consoante os valores de ureia presentes no sangue, ainda que este não seja o melhor marcador da eficácia do tratamento. Ainda assim, o seu uso prende-se com o facto da determinação de outras substâncias potencialmente mais relevantes serem de difícil deteção [27]. Desta forma, a eficácia da diálise é, atualmente, avaliada recorrendo ao índice Kt/V , onde Kt é o produto da taxa de eliminação de ureia por hemodiálise pelo período de tempo em que esta eliminação ocorre e V representa o volume de água corporal do paciente [42]. Uma vez que as medições da ureia no sangue não se podem realizar com a repetição necessária para definir uma resposta individual ao tratamento, ou seja, não são realizadas em todas as sessões de hemodiálise [42,35], o índice Kt/V representa o resultado acumulativo em vez de refletir a eficácia em cada sessão de hemodiálise [42].

Neste sentido, uma possível medição em tempo real da função renal traria avanços significativos no campo das doenças renais, podendo ser usado para avaliar a eficácia de cada tratamento de diálise [35]. Para a monitorização da hemodiálise é essencial uma técnica de deteção rápida, barata e não-invasiva, que poderia ser conseguida através de análises ao ar exalado, uma vez que os compostos eliminados durante a hemodiálise refletem a sua presença no ar exalado [27,43]. Estudos anteriores sugerem que a amónia presente na respiração possui uma boa correlação com os níveis de ureia no sangue (BUN, do inglês *Blood Urea Nitrogen*) e com a creatinina, sendo esta uma substância a ser apontada para controlar a eficácia da diálise [27,35]. Já foram realizados estudos recorrendo à técnica SIFT – MS (do inglês, *selected ion flow tube-mass spectrometry*) para avaliar a eficácia da hemodiálise. Os resultados deste

estudo, realizado por Endre et. al. (2011), revelaram que finalizado o tratamento há um decréscimo da concentração de trimetilamina (TMA), acetona e amónia, sendo que a TMA diminuiu mais rapidamente [35]. Outros estudos realizados com recurso a outras técnicas analíticas concluíram, igualmente, que após o tratamento de hemodiálise se verifica uma diminuição dos níveis de amónia [43,42,44].

2.7 Amónia

O grupo de trabalho da área de biomarcadores do *National Institutes of Health* (NIH) definiu um marcador biológico, ou biomarcador, como sendo “uma característica objetivamente medida e avaliada como um indicador de processos biológicos normais, processos patogénicos, ou uma resposta farmacológica a uma terapia de intervenção” [45]. Neste sentido, para o presente trabalho, a amónia (NH_3) assume um papel de destaque na medida em que é o biomarcador mais fortemente relacionado com as patologias renais.

A amónia é um dos compostos mais importantes presentes na urina, sangue e no ar exalado [26]. A sua produção ocorre durante o catabolismo das proteínas e a digestão dos alimentos [11,24]. No processo de digestão o alimento é dividido em aminoácidos, bases de nucleótidos e noutros compostos azotados que se difundem para o sangue [24]. Estes compostos azotados são absorvidos pelo fígado e convertidos em ureia, que é uma forma menos tóxica e possível de ser eliminada em pequenos volumes de água. Depois a ureia entra novamente na corrente sanguínea e é absorvida pelos rins, para posterior remoção sobre a forma de urina [24,46]. Nos indivíduos saudáveis, a conversão de amónia em ureia ocorre devido ao ciclo da ureia hepática [11,24]. Nas pessoas que sofrem de patologias renais a remoção de ureia não acontece, acumulando-se amónia em excesso no sangue [11,47]. Esta acumulação excessiva resulta num odor perceptível na respiração [11]. No sangue, a concentração normal da amónia situa-se entre 1,2 e 6,6 partes por bilião (ppb), podendo atingir níveis tóxicos, caso a função do fígado e/ou rins não esteja a ser corretamente efetuada [24]. Neste sentido, a medição dos níveis de amónia fornecem um bom indicativo do estado da função renal. É ainda importante ter em conta que, se os níveis de amónia apresentarem uma concentração superior à verificada no ar, esta difunde-se do sangue para os pulmões. Este processo permite a medição da amónia através da análise ao ar expirado [24].

A amónia tem sido alvo de um crescente interesse clínico, auxiliando na monitorização em hemodiálise, no diagnóstico da encefalopatia hepática, na avaliação da asma [24]. Estudos anteriores revelaram que no ar exalado de doentes com insuficiência renal existia amónia em quantidades mensuráveis, facto que se pode verificar de grande utilidade para comprovar a eficácia da hemodiálise [11,47]. A amónia apresenta-se, no ar exalado de um indivíduo saudável, na gama 50-2000 ppb [24]. Deste modo, valores que se encontrem fora deste intervalo podem ser indicativos de patologia, verificando-se uma ajuda no diagnóstico da doença.

3 ■ Considerações Físicas e Técnicas

A ciência subjacente à formação de iões no ar ambiente é conhecida desde finais do século XIX. No início do século XX, *Paul Langevin*, estudou o movimento de iões num campo elétrico, obtendo resultados que se assumiram como os princípios que regem a Espetrometria de Mobilidade Iónica (IMS, do inglês *ion mobility spectrometry* [12,48]. A IMS surgiu em finais da década de 70, tendo como características importantes o seu baixo custo, a rapidez de separações e a possibilidade de monitoramento em tempo real em condições normais de pressão e temperatura [48,49]. Esta técnica rapidamente encontrou aplicação militar na deteção de classes de compostos específicos, nomeadamente, na deteção de agentes de guerra química, drogas e explosivos [12,48,50].

A IMS faz a separação de iões tendo em conta a razão tamanho/carga e, se acoplada a uma Coluna Multicapilar (MCC, do inglês *multi-capillary column*), torna-se numa ferramenta analítica poderosa para a investigação da estrutura molecular e separação de amostras complexas. Este acoplamento é normalmente referido como MCC – IMS.

3.1. Princípios da Espetrometria de Mobilidade Iónica (IMS)

O termo Espetrometria de Mobilidade Iónica (IMS) refere-se aos métodos e instrumentação usados para a caracterização química de compostos com base na velocidade de iões em fase gasosa na presença de um campo elétrico [51]. Num equipamento tradicional de IMS utilizado para medições analíticas, um feixe de iões, conhecido como *swarm*, é submetido a um campo elétrico (E , em unidades $V.cm^{-1}$) [48,51]. A velocidade média atingida pelo feixe de iões acelerados é designada por velocidade de deriva (v_D , em unidades $cm.s^{-1}$) [48,51] ao longo do comprimento de deriva (l_D) e para intensidades baixas de campos homogêneos é diretamente proporcional à intensidade de campo elétrico [48].

$$v_D = K.E \quad (3.1)$$

Na equação 3.1, K é a constante de proporcionalidade definida como mobilidade iónica, representada em $cm^2.V^{-1}.s^{-1}$ [48]. De notar que a equação 3.1 é válida apenas para o conjunto de iões *swarm*, e nunca como cálculo da velocidade individual de cada um [51]. O valor da mobilidade iónica depende da densidade do gás, geralmente normalizada, em condições padrão, ou seja, uma temperatura T_0 de 273 K e uma pressão P_0 de 101325 Pascal, sendo

denominada, nestas condições, como mobilidade iónica reduzida (K_0 , em unidades $\text{cm}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$) [48].

$$K_0 = K \cdot \left(\frac{P}{P_0}\right) \cdot \left(\frac{T_0}{T}\right) \quad (3.2)$$

Na equação 3.2, T representa a temperatura em Kelvin e P a pressão em Pascal, medidas ambas no tubo de deriva durante a análise [48,12].

3.2. Componentes e função de um Espectrómetro de Mobilidade Iónica

Um IMS apresenta na sua constituição um sistema de recolha da amostra, uma câmara de ionização, uma região de reação, um canal de iões, uma região de deriva e um coletor de iões. É necessário, igualmente, uma fonte de tensão para gerar o campo elétrico. Além disso, para o seu completo funcionamento, é também necessário recorrer a fontes de limpeza dos gases de arraste e de deriva, eletrómetros rápidos, um controlador para a grelha e um sistema de análise de dados. O IMS pode, ainda, ser acoplado a uma coluna multicapilar (MCC) com o objetivo de separar misturas complexas e húmidas antes de entrarem no tubo de deriva [48].

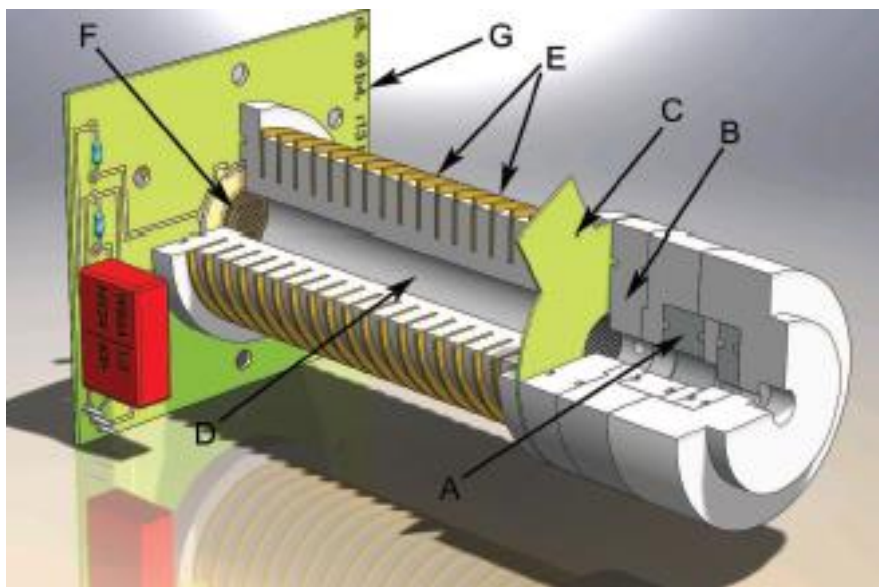


Figura 3.1 – Ilustração de um espectrómetro de mobilidade iónica. A - fonte de ionização, B - região de ionização, C – grelha de separação de iões; D – região de deriva; E – anéis de deriva; F- grelha de abertura; G – prato de Faraday. Retirada de [48].

Tal como referido, e visível na figura 3.1, o componente básico de um equipamento IMS é o tubo de medição, que se encontra dividido em duas partes, uma câmara de ionização (B) na qual são formados iões, e uma região de deriva (D), no fim da qual está posicionado o detetor.

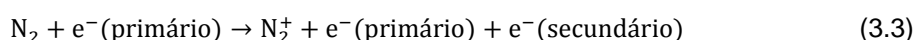
Estas duas regiões encontram-se separadas por uma grelha, identificada na figura 3.1 como C, denominada como grelha de *Bradbury-Nielsen* [12]. A abertura periódica desta grelha, normalmente a cada 100 ms e permanecendo aberta durante 300 μ s, possibilita a passagem de parte destes iões até à região de deriva [13].

Na câmara de ionização encontra-se o gás inerte que integra a atmosfera do IMS. Este é designado por gás de deriva e nos casos mais simples pode usar-se ar ambiente, sendo, no entanto, o gás mais utilizado o azoto [12]. Ao entrar nesta região, o gás de deriva sofre um conjunto de reações de ionização desencadeadas pela atividade da fonte de radiação, havendo libertação de eletrões. Estas reações originam iões, denominados iões reativos, que podem apresentar polaridade positiva ou negativa [51]. São os iões reativos os responsáveis pela ionização da amostra. Estes aparecem num espectro IMS como uma banda contínua de maior intensidade chamada RIP (do inglês, *reactant ion peak*). A medição, propriamente dita, inicia-se com a introdução de uma amostra em estado gasoso nesta porção do tubo de deriva. Aqui, as moléculas do analito são ionizadas por meio de reações iões-molécula, dando origem a iões-produto [43]. Deste modo, é formada a nuvem iónica que migrará para a região de deriva através da abertura da grelha de *Bradbury-Nielsen*, sobre um campo elétrico constante e contrariamente a um fluxo de gás neutro, até ao detetor de iões [52]. A alta taxa de colisões verificada entre os iões-produto e as moléculas do gás de deriva que se movem em sentido oposto impossibilita a obtenção de moléculas neutras na região de deriva e a formação de *clusters* [48]. Os iões são desta forma desacelerados dependendo da sua forma e tamanho, sendo, no caso ideal, totalmente separados, e são detetados em função do seu tempo de deriva (t_d) [48,51]. Como foi visto anteriormente, calculando-se o valor da velocidade de deriva alcançado pelos iões, pode determinar-se a mobilidade dos iões do analito.

3.3. Fonte de ionização e formação de iões reativos

Há diversas fontes de ionização que podem ser utilizadas num equipamento de IMS, sendo a sua escolha determinada pelo estado físico da matriz da amostra. Nestas incluem-se fontes radioativas (emissoras de partículas α ou β), descargas elétricas ou fontes de foto ionização como lasers ou lâmpadas UV [48]. Contudo, a fonte de ionização mais comumente utilizada neste tipo de equipamento é o ^{63}Ni [12,13,48]. O ^{63}Ni emite partículas β com energia média de 0,067 MeV, e possui um tempo de meia vida de 85 anos [12,48].

A ionização dá-se através da emissão de eletrões da fonte de ionização que, ao colidirem com átomos ou moléculas do gás de deriva, normalmente azoto, originam um ião positivo e um eletrão secundário (equação 3.3.) [12].

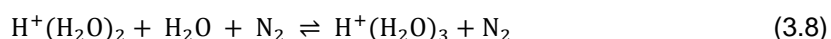
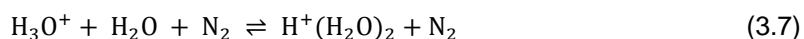


A ionização de mais moléculas de azoto continua a ser realizada pelos eletrões primários e secundários formados até que a energia destes seja inferior à necessária para formar um par

de iões de azoto [51]. Em cada colisão há perda de energia pelas partículas β de ^{63}Ni , sendo a energia média libertada de 35 eV. O azoto é ionizado enquanto a energia da radiação for superior ao seu potencial de ionização de 15,58 eV [12,48].

3.3.1. Formação de iões reativos de polaridade positiva

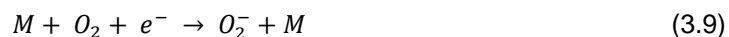
A formação de iões de azoto inicia um conjunto de reações em cadeia levando à formação de iões reativos de polaridade positiva, como apresentado pelas equações 3.4 a 3.8 [12,48,51].

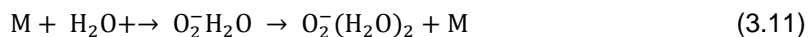


Observando as equações 3.7 e 3.8 verifica-se que os protões hidratados são os iões dominantes presentes na fonte iónica, sendo denominados de iões reativos [51]. Existem outros iões produto possíveis tais como $\text{NO}^+(\text{H}_2\text{O})_y$ e $\text{NH}_4^+(\text{H}_2\text{O})_x$ [48,51], no entanto, para valores de fluxos inferiores a 1400 mL/min há predominância de $\text{H}^+(\text{H}_2\text{O})_x$ [48]. O número de *clusters* de água, x , no ião reativo depende da temperatura e da quantidade de água que se encontra no gás de deriva [48,51].

3.3.2. Formação de iões reativos de polaridade negativa

Em azoto puro, ou noutro gás inerte, os eletrões são tão eficazmente termalizados que podem ser observados como eletrões livres no espetro de mobilidade. Estes eletrões termalizados podem ser espécies reativas quando se utiliza um destes gases como atmosfera da região de deriva. No ar, eletrões termalizados ou de baixa energia podem ligar-se ao oxigénio formando um ião negativo e hidratos, como descrito pelas equações 3.9 a 3.11, onde M pode ser O_2 , H_2O ou outra molécula neutra [48,51].





O número de moléculas de água que define um ião reativo estável está dependente da pressão ambiente e de condições de temperatura. Dependendo do gás utilizado durante as medições e da sua pureza podem verificar-se vestígios de $OH^-(H_2O)$, Cl^- , NO_2^- , CO_4^- e CN^- [48].

3.4. Formação de iões produto

A ocorrência de formação de iões reativos de polaridade positiva e negativa, referida anteriormente, pode também ocorrer na formação de iões produto. Os iões reativos são produzidos de forma contínua, sendo introduzidos na região de reação por meio de um campo elétrico. Quando se introduz a amostra a analisar na região de reação, as moléculas do analito colidem com os iões reativos lá existentes. É através destas colisões que se formam, então, os iões produto. Durante a colisão há formação de um produto intermediário ($[MH^+(H_2O)_n]^*$) que pode dissociar de volta a iões reativos ou formar iões produtos. A equação 3.12, apresentada abaixo, exemplifica a reação ocorrida, onde M representa a molécula de analito e Z é um elemento de estabilização do produto [51].



A reação apresentada é a via dominante para formar iões produto na polaridade positiva, sendo feita através de transferência de protões.

A formação de iões produto na polaridade negativa ocorre através da formação de um ião aduto, como é exemplificado pela equação 3.13 [48,51].



O ião aduto é estabilizado por colisão com um terceiro corpo, Z, e o ião produto é um ião hidratado estável entre M e O_2^- . Por vezes também podem ocorrer reações de transferência de carga ou abstração do protão [48,51].

3.5. MCC – IMS

As aplicações mais recentes da técnica de espectrometria de mobilidade iónica envolvem, na maioria dos casos, análises de misturas complexas e húmidas, nas quais se insere o ar exalado humano. Estas misturas carecem de pré-separação, sendo usada para este fim uma coluna multicapilar acoplada ao espectrómetro de mobilidade iónica [13]. Nas misturas

complexas pode ocorrer que vários analitos possuam tempos de deriva semelhantes, sendo necessário um outro parâmetro que permita a identificação inequívoca da substância. Com o uso de uma coluna multicapilar obtém-se uma maior informação, havendo um novo parâmetro de identificação de analitos – o tempo de retenção [53]. Adicionalmente, com a utilização da coluna elimina-se os possíveis efeitos da aglomeração de substâncias na câmara de ionização quando se analisam substâncias húmidas uma vez que as moléculas de água e de analito entram na câmara de ionização sucessivamente [53]. A combinação da espectrometria de mobilidade iónica com uma coluna multicapilar traduz-se em muitas vantagens, das quais são exemplo a enorme sensibilidade da técnica e a rapidez de análise que, nos casos mais demorados é de 5 minutos [50].

Esta ferramenta é de extrema importância uma vez que permite a deteção de substâncias relevantes mesmo em amostras cujo teor de humidade esteja próximo a 100%, não afetando os limites de deteção. Com o uso da técnica de pré-separação o analito é introduzido de forma descontínua para a coluna, através de uma válvula de 6 vias [53].

Relativamente à coluna em si, esta apresenta cerca de 1000 capilares, tendo cada um o diâmetro interno de 43 μm e a espessura de parede de 0,2 μm . Na sua totalidade a coluna apresenta um diâmetro de 3 mm e um comprimento de 20 cm, que é o comprimento de cada um dos capilares [54].

3.6. Outras técnicas

As duas últimas décadas foram marcadas por inúmeros avanços das recolhas de amostras e dos métodos de pré-concentração, havendo um desenvolvimento das técnicas analíticas de identificação de VOCs em várias matrizes biológicas, com destaque para a matriz respiratória [41]. Nestas técnicas encontra-se, naturalmente, o MCC-IMS, de elevada sensibilidade e rapidez de análise, aliado a uma enorme capacidade de separação da coluna multicapilar. Contudo existem também outras técnicas de análise de compostos voláteis, sendo aqui apresentadas o GC-MS, PTR-MS e SIFT-MS por se tratarem das técnicas analíticas de maior uso quando se trata de estudos de compostos voláteis no ar exalado [55]. Os aspetos relacionados com o princípio de funcionamento de cada uma das técnicas serão, apenas, levemente abordados, sendo dado maior relevo às características propriamente ditas.

A **cromatografia gasosa** (GC, do inglês *gas chromatography*) é dos métodos mais utilizados para análises de compostos presentes no ar exalado [29,39], e o primeiro método a ser utilizado para análise de compostos voláteis em amostras clínicas [41]. Para a análise a amostra é colocada na coluna cromatográfica, sendo depois transportada e separada através da coluna por um fluxo de gás inerte. A coluna GC é, desta forma a principal responsável por uma eficiente separação [39]. Esta pode ser combinada com vários métodos de deteção de compostos, como por exemplo a deteção de ionização de chama (FID, do inglês *flame ionization detection*), a espectrometria de massa (MS, do inglês *mass spectrometry*) ou

espetrometria de mobilidade iónica [29,39,41]. O detetor usado influencia a classe dos compostos voláteis detetados pelo GC, pelo que deve ser adequada ao tipo de análise que se pretende [41]. Quando se pretendem identificar substâncias desconhecidas tem de ser realizada a deteção por espetrometria de massa (GC-MS), o que torna esta técnica analítica a ferramenta mais poderosa para a identificação e quantificação de compostos voláteis [31,56]. A combinação destas duas técnicas permite alcançar uma sensibilidade na ordem dos 0,1 pptv e fazer a separação e identificação de vários compostos orgânicos e alguns gases inorgânicos [56]. A identificação dos compostos é feita com recurso a uma ampla biblioteca já existente por comparação com espectros de compostos conhecidos, que só é possível dada a antiguidade desta técnica. Contudo, a utilização desta biblioteca para interpretação dos resultados requer que o utilizador possua elevados conhecimentos de química. Apesar das inúmeras vantagens, a aplicabilidade desta técnica analítica em usos clínicos não é a mais adequada devido ao seu elevado tempo de análise que pode ir desde 60 minutos a 20 horas, ao que acresce o facto de necessitar de vácuo para funcionar, utilizando pressões na ordem dos 10^{-6} a 10^{-5} torr [56].

A espectrometria de massa associada a um tubo de deriva de seleção de iões (SIFT-MS, do inglês *selected ion flow tube-mass spectrometry*) é uma técnica analítica recente para quantificação de compostos voláteis presentes no ar em tempo real [39]. O SIFT-MS funciona através da ionização química dos elementos traço existentes numa amostra gasosa que é introduzida num fluxo de gás inerte, o gás de arraste através de iões percursores positivos, do qual são exemplos o H_3O^+ , o NO^+ ou O_2^+ , formando-se iões produto. Estes iões produto são depois detetados pelo espectrómetro de massa [29,39]. Nesta técnica, a recolha dos VOCs nas amostras é feita no tubo de deriva com a taxa de reação com os iões percursores controlada. Os iões resultantes destas reações, os iões produto, são analisados quantitativamente por MS [29]. Esta técnica apresenta, ainda, a vantagem de permitir a quantificação dos VOCs em tempo real [41].

A espetrometria de massa por reação de transferência de protões (PTR-MS, do inglês *proton-transfer reaction - mass spectrometry*) foi desenvolvida por Hansel, Jordan et al. com o propósito de analisar compostos presentes em amostras de ar em concentrações na gama ppb [39]. Nesta técnica analítica, tal como acontece com o MCC – IMS, não é necessário fazer-se pré-concentração da amostra [29,41]. No PTR-MS a ionização química é induzida por meio de reações de transferência de protões, sendo o H_3O^+ o ião reagente primário. Como a afinidade protónica da maioria dos VOCs é superior à afinidade protónica da água, ocorre transferência de protões em cada colisão [29,39]. Nesta técnica analítica a identificação das substâncias é feita exclusivamente pela sua relação massa-carga (m/z), sendo possível identificar e quantificar compostos orgânicos individuais com tempos de análise bastante inferiores ao GC-MS já que aqui a coluna cromatográfica não está presente [29,39,41].

Na tabela 3.1 encontram-se sintetizadas algumas das características das técnicas acima referidas, enaltecendo as vantagens e desvantagens de cada uma. São também lembradas as características do MCC-IMS para mais fácil comparação. A maior desvantagem do MCC-IMS face às outras técnicas apresentadas prende-se com o facto de ainda não ser possível identificar os compostos em análise uma vez que ainda não existem bibliotecas para comparação.

Tabela 3.1 – Vantagens e desvantagens de algumas das técnicas analíticas mais comuns para análise de VOCs.

Técnica Analítica	Vantagens	Desvantagens	Ref.
MCC - IMS	Não é necessária pré-concentração; Sensibilidade na gama dos pptv; Baixo custo do equipamento e análises; Medições em tempo real e <i>online</i> ; Sistema móvel; Pode ser utilizado ar como gás de arraste; Adequado para uso clínico.	A identificação química dos compostos ainda é difícil.	[12] [41], [51] [57], [58]
GC-MS	Reprodutibilidade; Sensibilidade na gama dos ppbv; Identificação de VOCs desconhecidos.	Sistema fixo (não móvel); Tempo de análises muito demoradas; Necessidade de pré-concentração; Custo elevado; Não são possíveis medições em tempo real; Não é adequado para uso clínico; Necessidade de vácuo. Os espectros resultantes são de difícil interpretação.	[39], [41], [31], [57], [56], [58]
SIFT-MS	Medições em tempo real e <i>online</i> ; Rapidez nas análises; Sensibilidade na gama dos ppbv; Sistema móvel.	Alguma fragmentação das moléculas a analisar; Custo elevado; Necessidade de vácuo.	[39], [41], [31]
PTR-MS	Não é necessária pré-concentração; Sensibilidade na gama dos ppbv; Medições em tempo real e <i>online</i> .	Alguma fragmentação das moléculas a analisar; Custo elevado; Necessidade de vácuo.	[39], [41], [31],

4 ■ Materiais e Metodologia

4.1. BreathSpec®

Na realização deste estudo foi utilizado como ferramenta de trabalho o BreathSpec®, cujo fabrico está a cargo da empresa G.A.S. *Gesellschaft für analytische Sensorsysteme mbH*, com sede em Dortmund, Alemanha. O BreathSpec®, dotado da tecnologia analítica de espectrometria de mobilidade iónica, apresentado na figura 4.1, ostenta reduzidas dimensões, conferindo-lhe portabilidade, uma característica importante para este trabalho uma vez que a recolha será feita em meio hospitalar.

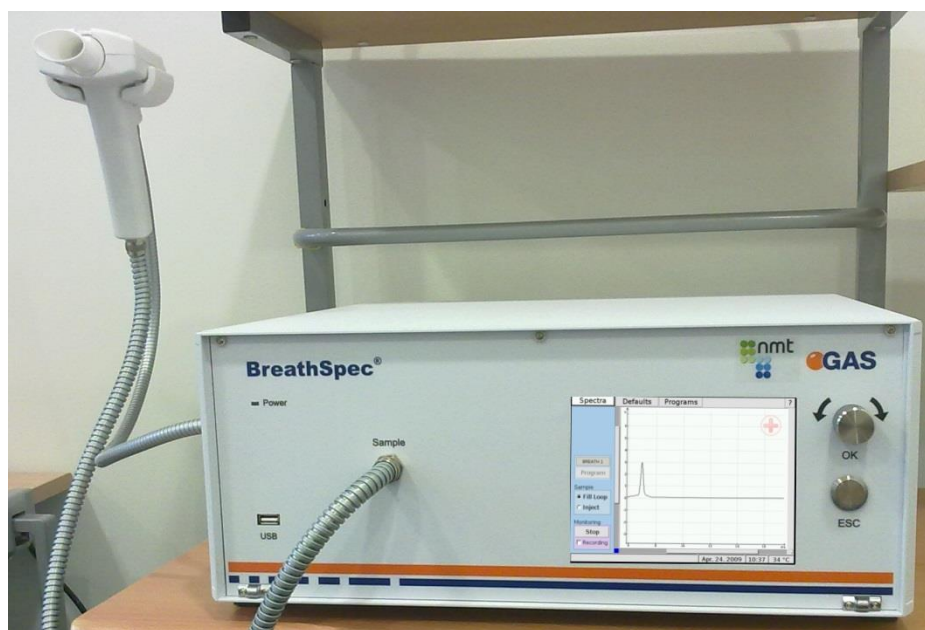


Figura 4.1- Imagem do BreathSpec. Imagem obtida em laboratório.

O equipamento apresenta uma janela de visualização frontal e um botão rotativo de seleção. O botão rotativo permite a escolha e seleção dos parâmetros de aquisição, por exemplo, a escolha dos fluxos de arraste e de deriva, do tempo de aquisição, ou mesmo a seleção de programas previamente elaborados com parâmetros já definidos. A janela de visualização frontal permite ver, para além dos parâmetros técnicos, a análise da amostra em tempo real. Verifica-se ainda a existência de um LED *Power*, indicativo do estado de funcionamento do aparelho. Este possui, ainda, uma entrada USB que permite retirar os espectros obtidos, ficando estes disponíveis para posterior tratamento de análise.

A entrada da amostra, o ar exalado, dá-se através da entrada *Sample*. Esta entrada encontra-se ligada a um espirómetro por meio de um tubo, como se pode ver nas figuras 4.1 e 4.2. O espirómetro é um componente fulcral no processo de recolha pois é através deste que o colaborador em estudo irá soprar, dando início à entrada da amostra no equipamento. O espirómetro é dotado de um sensor de CO_2/O_2 como garantia de que apenas o ar alveolar entra no BreathSpec®, sendo a análise efetuada apenas sobre este. Na figura 4.2 é evidenciado o papel do espirómetro no processo de recolha de amostras de ar exalado.

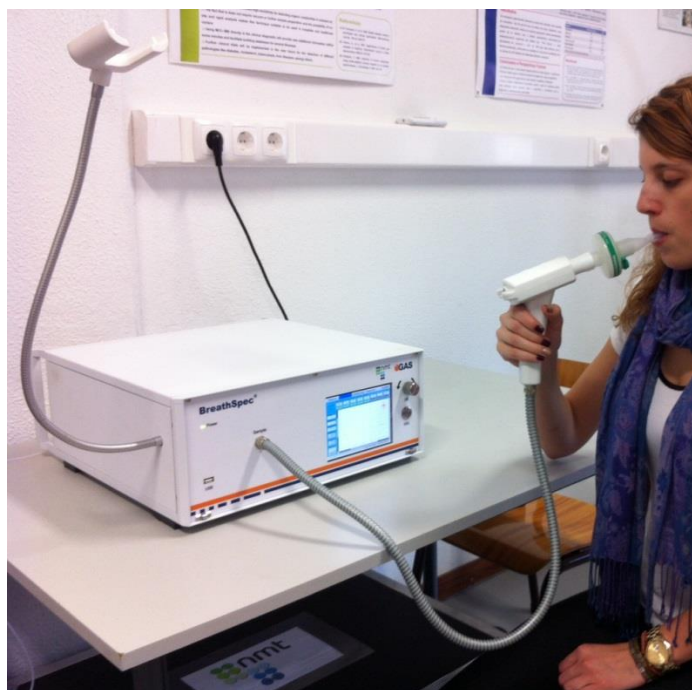


Figura 4.2 - Recolha de uma amostra de ar exalado. Imagem obtida em laboratório.

Tabela 4.1 – Especificações técnicas do espirómetro usado para ligação ao equipamento BreathSpec®.

	CO_2	O_2	Volume de fluxo
Amplitude	0-10 Vol% CO_2	10-21 Vol% O_2	0-16 l/s
Resolução	0,01 Vol% CO_2	0,01 Vol% O_2	
Precisão	$\pm 0,1$ Vol% CO_2	$\pm 0,1$ Vol% O_2	< 0,3%
T_{10-90}	< 100 ms	< 100 ms	< 100 ms

O painel posterior do BreathSpec® possui diversas funcionalidades e entradas, estando estas relacionadas com requisitos iniciais de funcionamento do próprio aparelho. É neste que se encontra a entrada para o transformador que possibilita a alimentação do aparelho, por meio de corrente elétrica. Existe, também, um botão *Power*, que permite ligar ou desligar o aparelho,

bem como outras entradas que possibilitam a ligação a outros equipamentos externos (por exemplo, modem ou computador).

Ainda no painel posterior do BreathSpec® destacam-se a existência de entradas para os gases de deriva e de arraste, denotadas no aparelho como *Driftgas* e *Carriergas*, respetivamente. Para além destas, existem duas saídas, uma para a amostra que é denominada como *Sample* e outra para o gás. É através destas entradas e saídas que ocorre a entrada do azoto, importante para a formação do RIP e transporte da amostra, bem como a posterior saída deste mesmo gás e quantidades de amostra em excesso. Uma vez que todos os compostos envolvidos nas análises são de natureza não tóxica, a sua evacuação pode ser realizada para a atmosfera envolvente, não acarretando qualquer risco.

No que respeita a aspetos internos, é apresentado na figura 4.3 um esquema do interior do aparelho onde são apresentados os seus componentes principais.

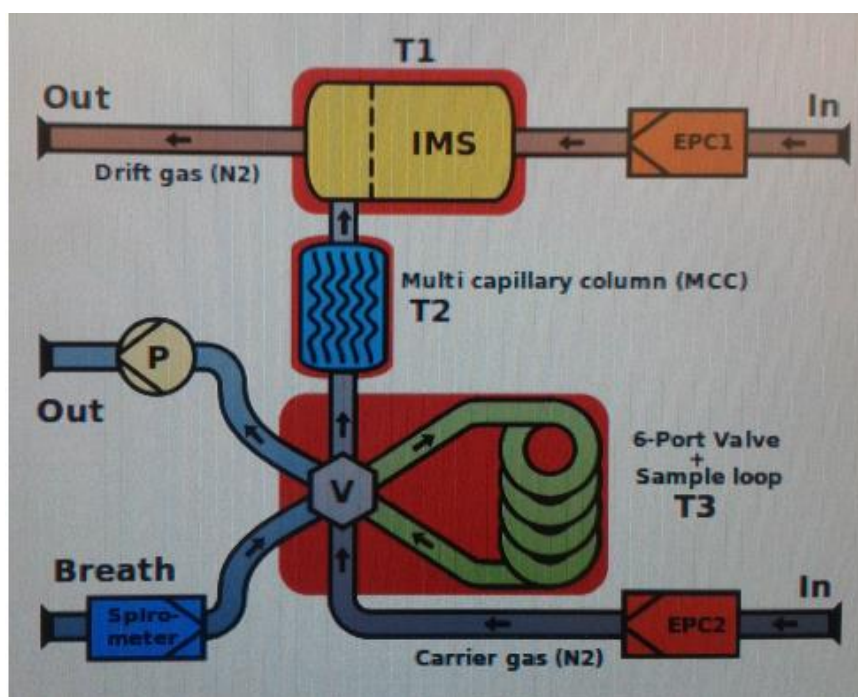


Figura 4.3 – Esquema interno de funcionamento do BreathSpec® [59].

Desta forma, no que respeita ao interior, o MCC-IMS é constituído por:

- um sistema de introdução de amostra – o espirómetro (*Breath*);
- uma válvula de 6 vias (V);
- um *loop* (*Sample loop*);
- uma coluna multicapilar (MCC);
- o IMS, o qual inclui uma câmara de ionização, grelha de separação de iões, o tubo de deriva e um coletor de iões;
- uma bomba de sucção (P);

- dois fluxómetros (EPC1 e EPC2);
- sensores de temperatura (T1, T2 e T3).

As amostras de ar exalado a serem analisadas são introduzidas no aparelho através do espirómetro. Quanto à entrada dos outros gases necessários à própria realização da análise, o gás de deriva e de arraste, estes são introduzidos através dos fluxómetros, respetivamente, através do EPC1 e EPC2. Neste estudo, o gás usado foi o azoto 5.0.

A válvula de 6 vias possui duas posições de funcionamento e é a responsável pela introdução da amostra e do gás de arraste no *loop*. Desta forma, quando a válvula se encontra na posição padrão (Posição A) ocorre o “Enchimento do *Loop*”, ou seja, a bomba P é ligada, conduzindo ao arraste da amostra para o interior do *loop*. O *loop* possui uma capacidade de 5 ml, por isso caso a quantidade de amostra ultrapasse este valor é retirado o excesso através da bomba. A bomba trabalha, normalmente, com uma potência que 25%, valor este sugerido no manual do BreathSpec®. No final deste processo a bomba é desligada, e a válvula altera para a segunda posição de funcionamento – posição B. Nesta posição, dá-se a entrada do gás de arraste no *loop* que, como o nome indica, vai arrastar toda a amostra ao longo do *loop* até à coluna multicapilar.

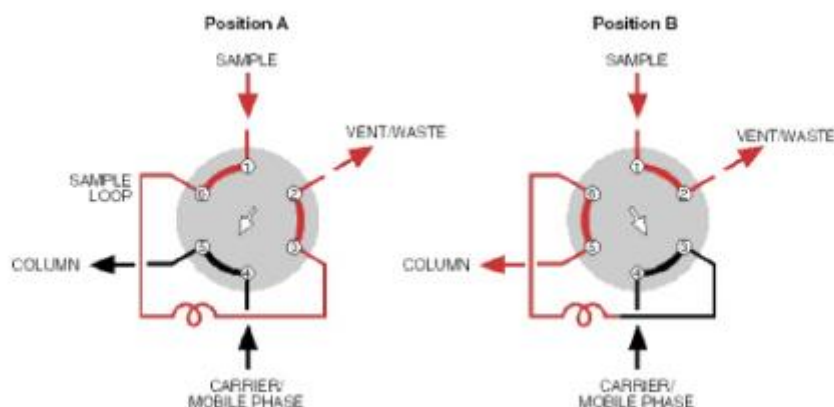


Figura 4.4 – Esquemático do funcionamento da válvula na posição A e B do BreathSpec® [59].

Uma vez na coluna multicapilar, os compostos sofrem a primeira separação e dão entrada na região de ionização, onde serão analisados de acordo com o princípio descrito anteriormente no capítulo 3.

Na tabela 4.2 são apresentadas algumas das características do BreathSpec®.

Tabela 4.2 – Alguns aspetos técnicos do equipamento BreathSpec® [59].

Peso	15,5 Kg
Dimensões	449 × 375 × 177 mm (L×P×A)
Consumo Energético	<160 W
Método e fonte de ionização	Fonte de radiação β (Trítio – ^3H)
Atividade da fonte	300 MBq
Polaridade	Positiva ou negativa
Comprimento do tubo de deriva (l_d)	5 cm
Comprimento da coluna multicapilar	20 cm

4.2. Mobilidade em meio hospitalar

Apesar da mobilidade que o aparelho IMS apresenta, esta por si só, não era adequada para uso em meio hospitalar.

Desta forma, utilizou-se uma estrutura de transporte que já tinha sido anteriormente concebida para esta finalidade, aquando da realização de um estudo anterior. Esta estrutura é feita em aço inoxidável e com dimensões de 98 x 57 x 86 cm (C x L x A) o que a torna viável para uso em ambiente hospitalar, e em particular neste estudo.

Esta estrutura foi projetada tendo em conta a totalidade de componentes necessários ao correto funcionamento do IMS e consequente aquisição de dados. A prateleira superior possibilita que se coloque um computador portátil, útil para a visualização do espectro poucos minutos após a recolha de uma amostra.

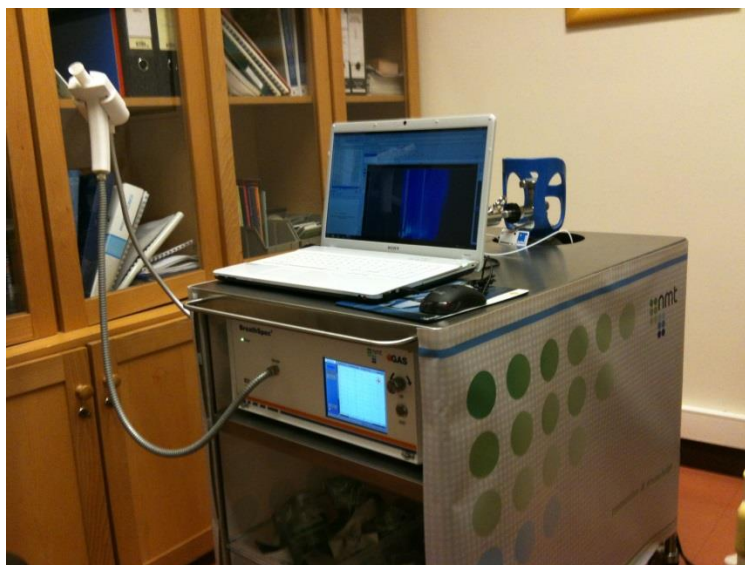


Figura 4.5 – Estrutura de transporte com a montagem do equipamento. Imagem tirada em meio hospitalar.

Durante o planeamento da estrutura foi também tida em conta a necessidade de incluir a garrafa de azoto, indispensável ao funcionamento do IMS, na estrutura de transporte. Desta forma, o melhor dimensionamento encontrado foi colocar a garrafa na parte traseira, pois para além de ser esteticamente mais apelativo também facilitava as ligações ao aparelho.

Na figura 4.5 é visível a estrutura já com a garrafa de azoto integrada, onde é visível que houve necessidade de se fazer uma abertura na estrutura de forma a incluir lá a garrafa.

4.3. Material

Para a realização deste trabalho experimental não foi necessária uma grande quantidade de materiais uma vez que a técnica de espetrometria de mobilidade iónica acoplada a uma coluna multicapilar, ao contrário de outras técnicas, não necessita de vácuo ou de uma pré-concentração da amostra.

Na tabela abaixo é apresentada uma síntese do material utilizado.

Tabela 4.3 – Síntese do material utilizado na recolha das análises.

Material
BreathSpec®
Computador e acessórios de ligação
Botija de gás de azoto 5.0
Medidor de tensão
Higrómetro
Tubo de <i>Teflon</i> de 3 mm
Filtros e boquilhas descartáveis

4.4. Procedimento experimental

A recolha dos dados do grupo de estudo foi toda realizada em meio hospitalar, no caso, no serviço de Nefrologia do Hospital Garcia de Orta. A seleção dos candidatos foi realizada por parte dos colaboradores deste serviço hospitalar, tendo em conta a melhor representação possível dos doentes para o estudo em questão. Tratando-se de participantes na sua generalidade de idades mais avançadas, a sua participação no estudo teve em conta a capacidade dos mesmos em conseguir soprar pelo bocal descartável colocado no espirómetro, durante o tempo necessário à recolha.

Antes de cada recolha, cada colaborador foi informado do âmbito do estudo e teve de preencher uma folha de registo e o consentimento informado, ambos os modelos apresentados em anexo, respetivamente o anexo I e II. Os colaboradores participaram voluntariamente no estudo e, os dados recolhidos são anónimos e apenas para uso no âmbito deste estudo, previamente aprovado pela Comissão de Ética do Hospital Garcia de Orta. Apesar dos dados retirados aquando da análise (anexo I), outros dados complementares foram fornecidos pelos médicos responsáveis e, podem ser consultados no anexo III.

A recolha das amostras de ar exalado ocorreu ao longo de três semanas. Neste período, às segundas e terças-feiras foram recolhidas amostras de doentes em estádios intermédios da doença. Às quartas, sextas e sábados foram recolhidas as análises de doentes em estágio final da insuficiência renal crónica, ou seja, em doentes submetidos à prática de hemodiálise. Este planeamento foi elaborado de forma a não interferir com a logística do serviço de Nefrologia e, portanto, não se efetuaram recolhas à quinta-feira por necessidade do gabinete médico destinado a este fim.

Os participantes neste estudo que constituíram o grupo de pacientes em estágio intermédio encontravam-se no estágio 3 e 4 (DRC3 e DRC4). Uma vez que a insuficiência renal apresenta sintomas iniciais quase inexistentes quando um paciente procura ajuda médica já se encontra num estado mais avançado de progressão e, portanto, só foram feitas análises do ar exalado nos estádios de maior evolução da doença.

Todos os pacientes em estágio final que participaram no estudo realizavam hemodiálise três vezes por semana, com a duração de 4 horas cada tratamento. Diariamente existem, no serviço de Nefrologia do HGO, três turnos de hemodiálise, o turno das 08-12h, das 13-17h e das 18-22h e, geralmente, um mesmo doente costuma frequentar sempre o mesmo turno. No que respeita aos dias do tratamento, existem os “doentes ímpares” e os “doentes pares”. Os “doentes pares” realizam o tratamento às segundas, quartas e sextas-feiras, e os “doentes ímpares” às terças, quintas e sábados. Como já foi referido anteriormente, só foram recolhidas análises aos doentes em hemodiálise às quartas, sextas e sábados para retratar o mais fielmente e em iguais condições a totalidade das medições feitas. Com este propósito não se realizaram recolhas do ar exalado de doentes em hemodiálise às segundas e terças-feiras uma vez que nestes dias estes doentes ficavam sujeitos a um maior período sem realizar o tratamento.

Dos que estavam neste estágio, 7 apresentavam diabetes e 7 tinham problemas de hipertensão arterial. Outros possuíam diferentes patologias, em reduzido número, como cancro, doenças vasculares e doenças respiratórias. A recolha das amostras de ar exalado nestes doentes foi efetuada antes e após o tratamento de hemodiálise. Durante estas recolhas eram efetuadas análises ao ar da sala sempre que possível.

A tabela 4.4, apresentada abaixo, sintetiza as informações mais relevantes relativas aos pacientes pertencentes ao grupo que realiza hemodiálise. Na tabela 4.5, apresentam-se as informações respeitantes aos pacientes em estádios intermédios, ou seja, relativas aos estádios 3 e 4 da doença renal crónica.

Tabela 4.4 – Tabela com os dados dos pacientes em tratamento de hemodiálise.

Id	Idade	Sexo	Peso no início da sessão (kg)	Tensão arterial no início da sessão	Peso no final da sessão (kg)
H01	62	F	74,3	112/86	72,5
H02	55	F	69,2	146/72	67,3
H03	69	M	58	116/62	57,9
H04	34	M	66,9	227/124	62,5
H05	38	M	63	134/87	62,3
H06	82	M	76,2	114/54	74,3
H07	81	M	58,2	102/57	56,3
H08	57	M	95,4	160/76	93,1
H09	42	M	68	157/82	66,3
H10	89	F	47,8	141/51	46,1
H11	79	M	52	131/81	50,4
H12	69	M	76,7	91/63	74
H13	63	M	85	161/63	83,5

Tabela 4.5 – Tabela com os dados dos paciente em estágio intermédio da doença (DRC3 e DRC4).

Id	Idade	Sexo	Peso (kg)	Tensão arterial
I01	86	M	73	164/80
I02	78	M	68	-
I03	80	M	92	183/68
I04	77	M	80	127/59
I05	67	M	72	123/72
I06	77	M	63	119/62
I07	85	F	50	126/76
I08	82	F	-	162/75
I09	87	M	80	177/77
I10	54	M	92	146/66
I11	65	F	80	188/91
I12	77	F	78	137/73
I13	82	F	52	149/78
I14	66	M	81	114/65

Para além das recolhas ao ar exalado referidas, foram ainda efetuadas análises a um grupo de controlo constituído por 17 voluntários saudáveis. Estas análises recorreram na

Faculdade de Ciências e Tecnologia onde, estes voluntários efetuaram um teste igual ao realizado pelos dois grupos anteriores. Antes de se iniciar a recolha da amostra de ar exalado, o procedimento foi semelhante, sendo retirados alguns dados e informando o voluntário da necessidade de assinar o consentimento informado.

Os espetros de ar exalado obtidos do grupo de controlo são importantes para a comparação com as análises obtidas anteriormente, visando estabelecer picos característicos no ar exalado de doentes renais. Também foram realizadas análises ao ar da sala antes e após a recolha das amostras, úteis para comparação de espetros.

Para a aquisição das análises foi elaborado no BreathSpec® um programa, denominado Breath_5M, cujas características são apresentadas na tabela 4.6.

Tabela 4.6 – Programa de análise BREATH_5M implementado no BreathSpec® definido para os procedimentos de recolha do ar exalado.

Spectra	Time	V	P	R	E1	E2	T1	T2	S
0	0 ms	I	I	rec	I	I	I	I	I
16	2,016 s	open	I	I	I	I	I	I	I
40	5,040 s	close	I	I	I	I	I	I	I
1425	03m00s	I	I	stop	I	I	I	I	I
1426	03m00s	-	-	-	-	-	-	-	-

Legenda:

V – Válvula: definir a posição da válvula

P – Bomba: escolha do fluxo de funcionamento (%)

R – Gravação do espectro (rec ou stop)

E1 – Fluxos do gás de deriva

E2 – Fluxos do gás de arraste

T1 – Temperatura do IMS

T2 – Temperatura da MCC

S – Área de análise de substâncias

Os volumes do gás de deriva e de arraste utilizados foram, respetivamente, 500 ml/min e 25 ml/min. Estes valores foram assim definidos tendo em conta experiências anteriores que demonstram que esta é a combinação de fluxos que permite uma melhor separação dos compostos.

No programa definido o tempo total de cada análise é de 3 minutos. Este tempo foi definido tendo em conta que se tratam de análises em meio hospitalar, e como tal a rapidez é um requisito importante a ser tido em conta. Este intervalo de tempo diz respeito ao tempo que o BreathSpec® demora a fazer o processamento dos analitos após a introdução do ar exalado, não se podendo efetuar novas análises. Apesar da rapidez da análise ser um requisito

fundamental, o tempo escolhido garante uma correta separação dos compostos uma vez que testes anteriores o comprovam.

4.5. Aquisição e tratamento de dados

4.5.1. Software LAV

Para o tratamento dos dados foi utilizado um *software* denominado LAV, igualmente desenvolvido pela empresa G.A.S. Este possibilita a visualização dos espectros e posterior tratamento, obtidos com o aparelho BreathSpec®. No presente estudo, foi utilizada a versão 2.1.0 do referido programa.

Finda a análise da amostra pelo BreathSpec®, o *software* LAV grava o espectro de cada análise efetuada num ficheiro do tipo *.mea*, permitindo o seu visionamento por parte do utilizador como um mapa de cores. O LAV possibilita, ainda, a visualização simultânea de espectros individuais de cada um dos picos obtidos. Este tipo de espectro corresponde ao espectro de mobilidade, obtido através da análise realizada no tubo de medição IMS, ao passo que o mapa de cores acrescenta a informação relativa ao tempo de retenção associado à coluna multicapilar. A escolha por uma ou outra forma de visualização apresenta vantagens consoante o fim que se pretenda. O espectro de mobilidade possibilita a visualização linha a linha, assumindo especial relevância na determinação da altura ou forma de um pico para um determinado tempo de retenção fixo ao longo do tempo de deriva. O mapa de cores é construído tendo por base o valor da intensidade, em volts. O valor da intensidade está associado a uma escala de cores, com início na cor preta para valores negativos de intensidades até ao branco, que corresponde a um valor máximo de intensidade e à saturação.

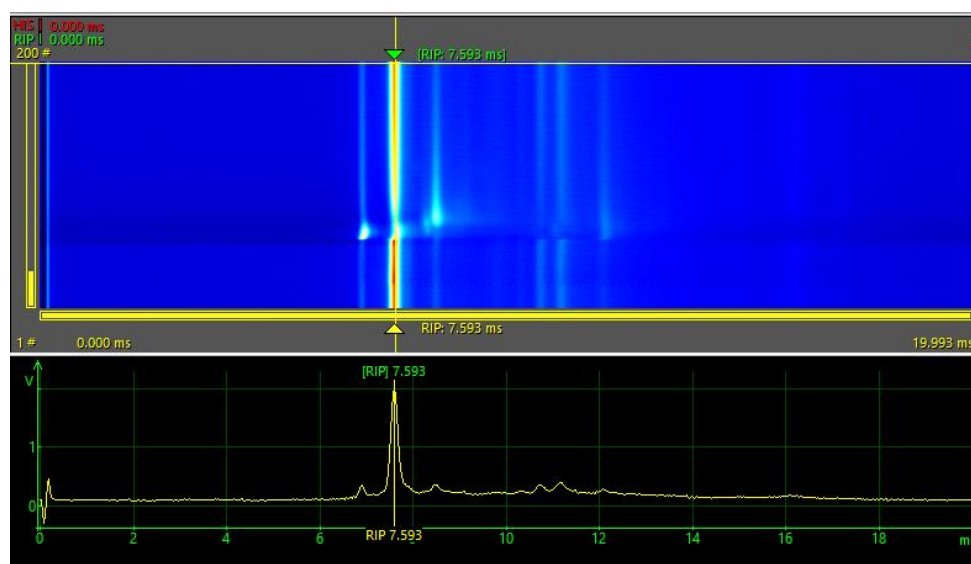


Figura 4.6 - Imagem obtida de uma análise de ar exalado efetuada em laboratório, usando-se o *software* LAV. Na figura superior é visível a representação em mapa de cores, onde é apresentado o tempo de deriva no eixo dos xx e o tempo de retenção no eixo dos yy. Na figura de baixo, encontra-se representado o correspondente espectro de mobilidade.

Seguidamente à cor preta, com aumentos progressivos da intensidade aparecem gradualmente o azul-escuro, que dá lugar a tons de azuis mais claros e, posteriormente, ao verde, rosa e vermelho e, por fim, ao branco. Na figura 4.6 pode ver-se uma imagem representativa dos espetros referidos.

Na figura 4.7 é apresentada a janela de visualização do *software* onde podem ser vistos ambos os espetros referenciados anteriormente. Nesta figura destacam-se, essencialmente, as três regiões de maior importância.

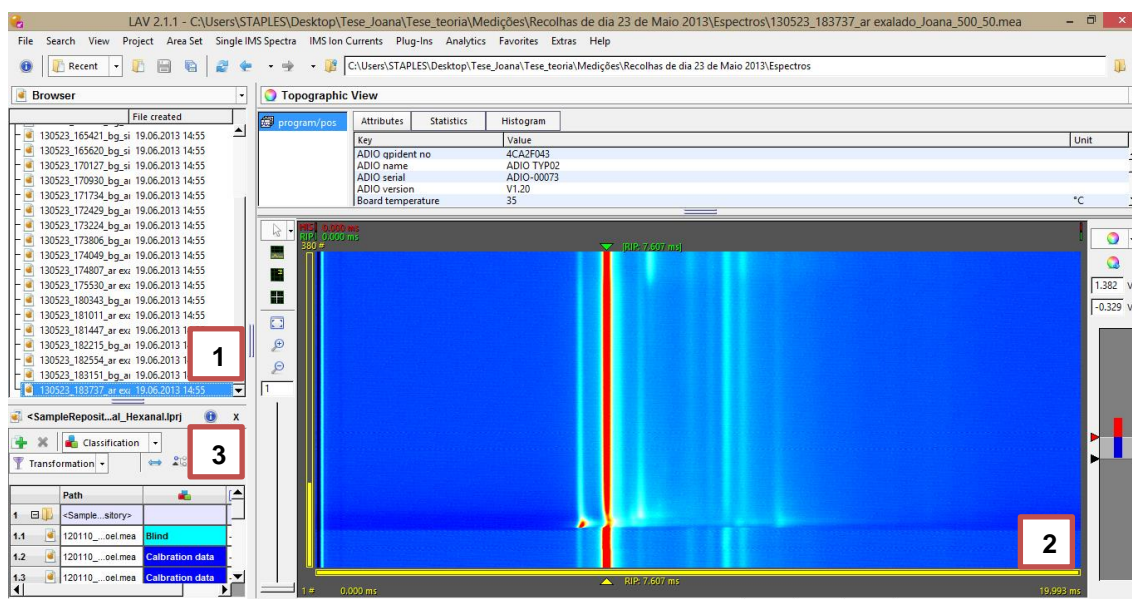


Figura 4.7 - Janela de visualização do LAV. (1) Listagem dos ficheiros obtidos e guardados numa mesma localização (pasta). (2) Área de observação do(s) espetro(s) seleccionado(s), com possibilidade de diferentes visualizações. (3) Listagem de ficheiros previamente seleccionados, com possibilidade de os guardar sob a forma de novo projeto. Imagem obtida em laboratório.

Na região 1, o utilizador tem ao seu dispor o conjunto de ficheiros que tinha guardado numa mesma localização (pasta). Este pode alternar entre cada um dos ficheiros sendo que, o seleccionado aparece representado na região 2.

Na região 2 é, então, possível visualizar-se o espetro em mapa de cores como foi apresentado na figura 4.6. Esta área compreende, ainda, outras funcionalidades e modos de apresentação de espetros, como já foi referido anteriormente. É possível, por exemplo, fazer *zoom*, alterar alguns parâmetros relevantes, ou modificar a escala de cores de forma a evidenciar aspetos do espetro ao critério do utilizador. Esta é a ferramenta fulcral do LAV uma vez que permite ao utilizador ver o resultado das medições.

A região 3 é talvez a menos importante, sendo esta útil para uma melhor organização dos dados ao apresentar um conjunto de espetros escolhidos pelo utilizador tendo em conta o seu interesse. Permite, ainda, guardar o conjunto de espetros sob a forma de um projeto.

O LAV dispõe de múltiplas funcionalidades, destacando-se a definição do *Areaset* como umas das mais importantes e usadas. As características desta funcionalidade prendem-se com a possibilidade de delimitação dos picos relevantes, bem como da sua possível identificação

pelo utilizador. A vantagem desta ferramenta reside na possibilidade de poder fazer-se comparação dos picos seleccionados nos restantes ficheiros.

Após a definição do *Areaset*, pode recorrer-se a uma função existente no LAV denominada *Analyze Areaset*, que à semelhança do que o nome indica permite fazer a análise da área demarcada pelo utilizador. Realizando esta análise podem verificar-se os valores de certos parâmetros, a saber, o tempo de deriva, o tempo de retenção e a intensidade dos picos. Esta função fornece igualmente informações acerca do RIP. Sempre que se faz a análise com esta ferramenta são gerados 13 ficheiros do tipo *.csv*, um ficheiro *pdf* e um do tipo *.lmc* (ficheiro de configuração) onde se encontram as informações acerca dos picos estudados.

4.5.2. Software VOCInspect

O software VOCInspect, criado pela empresa NMT, S.A., permite detetar automaticamente picos presentes nos espectros provenientes do MCC-IMS. A deteção dos picos é feita com recurso a uma biblioteca, ou seja, este software permite a deteção de um composto se os valores de um determinado pico coincidirem com algum existente na base de dados. Para além desta funcionalidade, o VOCInspect possibilita a remoção do espectro do ar ambiente a um espectro de ar exalado e, visualização do espectro resultante desta subtração. Esta funcionalidade é particularmente útil pois permite remover do espectro do ar exalado a influência de VOCs existentes no ar ambiente, possibilitando uma maior clareza da informação contida no espectro. O VOCInspect trabalha com ficheiros com a extensão *.csv* que podem ser convertidos diretamente do LAV ou guardados a partir deste software.

Na figura 4.8 é apresentada a janela inicial do software.

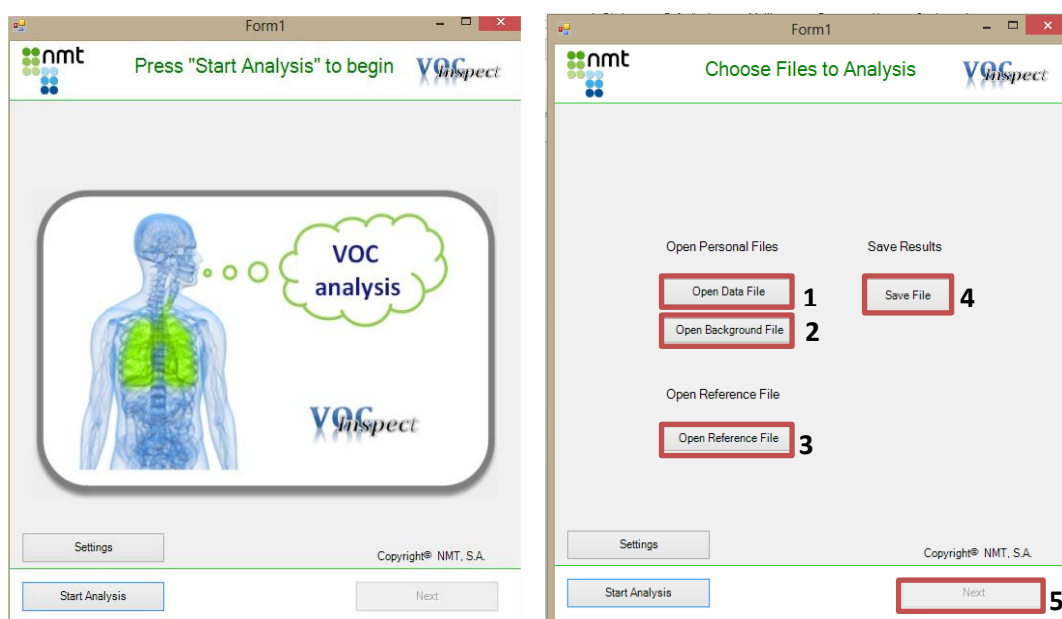


Figura 4.8 – Ecrã inicial do software VOCInspect. O início da análise ocorre pressionando o botão “Start Analysis” que dá origem à janela “Choose Files to Analysis”.

Quando o utilizador seleciona o comando “*Start Analysis*” são exibidos três botões para carregar diferentes ficheiros necessários à análise. Os botões citados são o “*Open Data File*”, o “*Open Background File*” e o “*Open Reference File*” e podem ser vistos na figura 4.8.

O botão *data file* (1) serve para submeter o espectro em análise e o botão *background file* (2) tem como finalidade a submissão do espectro do ar ambiente recolhido aquando da análise, para posterior subtração. No caso de apenas se querer fazer a visualização de um espectro usa-se o botão *reference file* (3).

É possível já nesta fase guardar o resultado da subtração dos espectros, através do comando *save file* (4), apesar de ser mais indicado fazê-lo após a visualização da subtração. Esta visualização pode ser feita premindo o botão *next* (5), que entretanto fica com cor verde como sinal de um correto carregamento dos espectros.

O *software* permite também a visualização de ficheiros previamente guardados, fazendo-se o carregamento do mesmo através do botão *Open data file* (1), possibilitando, ainda, fazer-se comparações através da visualização em simultâneo do espectro de referência se este for submetido através do botão *Open Reference File* (3) pelo utilizador.

Após premir o botão *Next*, o utilizador tem ao seu dispor duas funcionalidades:

- **Search for Biomarkers** – Pesquisa a presença de determinado VOC previamente selecionado da base de dados existente.
- **General Screening** – Permite a visualização do espectro.

Ao escolher a opção *General Screening* e, se previamente fosse submetido um espectro do ar exalado e um do ar da sala como referência, seria feita uma subtração como a que se pode ver na figura 4.9.

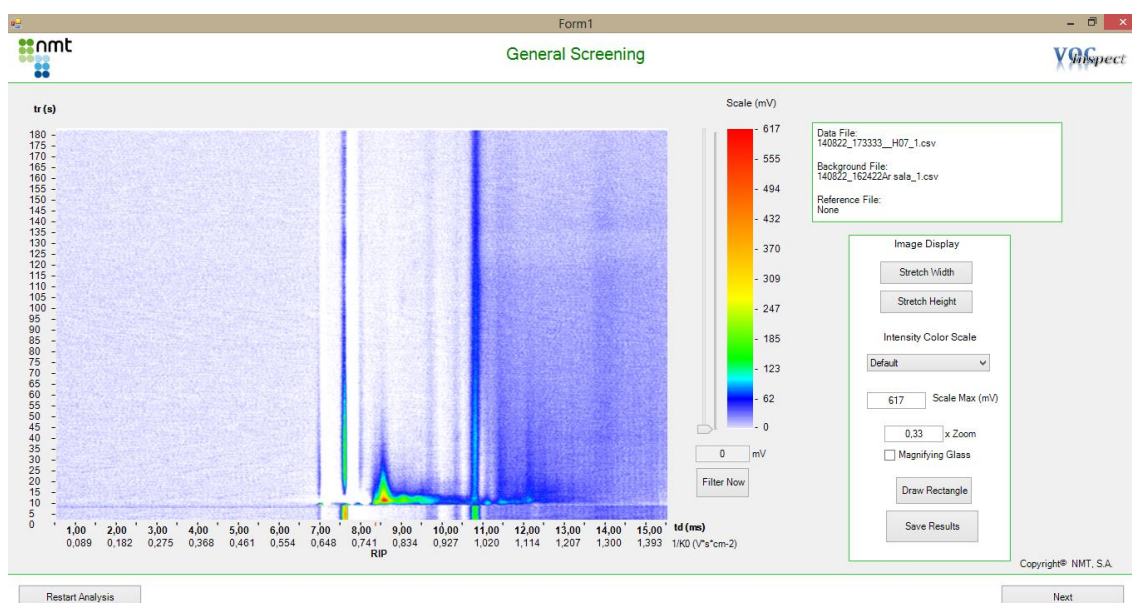


Figura 4.9 – Janela de visualização do VOCInspect onde se apresenta um espectro resultante da subtração do ar da sala ao ar exalado de um colaborador. Imagem obtida em laboratório.

No que respeita a visualização de espetros este permite fazer *zoom* e desenhar no próprio espetro para evidenciar determinados picos. As escalas são dinâmicas, estando representado o tempo de retenção em segundos no eixo vertical, e o tempo de deriva em milissegundos e $1/K_0$ em cm^{-2}Vs no eixo horizontal.

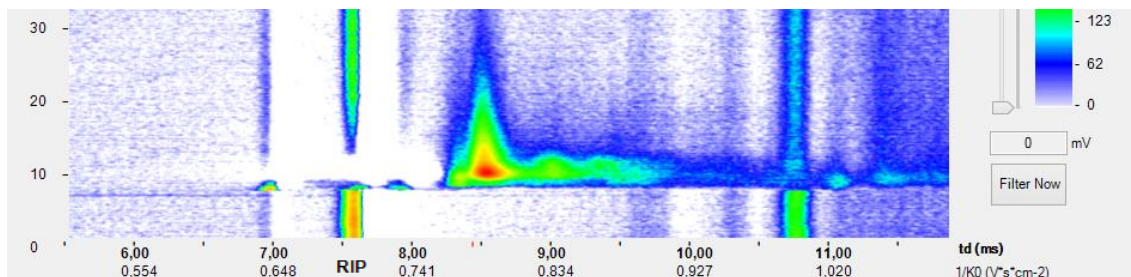


Figura 4.10 – Imagem obtida através do *software* VOCInspect com representação no eixo vertical do tempo de retenção e no eixo horizontal do tempo de deriva e do valor de $1/K_0$.

O espetro final é resultado de uma subtração por isso, geralmente, o RIP desaparece. Por vezes este não desaparece totalmente devido a ligeiras alterações no valor da sua intensidade em diferentes análises, contudo, este é calculado e apresentado no eixo horizontal. O *software* VOCInspect apresenta ainda outra funcionalidade – uma escala de valores de intensidade em milivolts que podem ser aplicados ao espetro em análise e que tem a vantagem de eliminar o ruído. O utilizador pode escolher um valor de intensidade, aplicando-o ao espetro premindo o botão *Filter Now*. Finalizada a análise, o espetro resultante pode ser guardado premindo o botão *Save Results*.

5 ■ Resultados e Discussão

5.1. Tratamento de dados

Como já foi referido, este estudo vem no seguimento de uma prova de conceito já realizada anteriormente, cujos resultados promissores elevaram o interesse por esta área. No estudo precedente apenas tinham sido recolhidas amostras de ar exalado de doentes que realizavam hemodiálise, sendo estas amostras colhidas uma única vez, apenas antes do início do tratamento. Os espectros provenientes dos doentes em hemodiálise quando comparados com um grupo de controlo revelaram a existência de três picos característicos que não se encontravam no grupo de controlo, constituído por indivíduos saudáveis [52].

No presente estudo foram recolhidas amostras de ar exalado a doentes em hemodiálise antes do início do tratamento com o objetivo de se avaliarem se os picos anteriormente detetados são recorrentes neste estudo. Adicionalmente, efetuaram-se também recolhas nos mesmo doentes após o tratamento de hemodiálise a fim de se estudarem eventuais diferenças nos espectros após o tratamento. Dadas as características evolutivas da doença e a sua separação por estádios, foram também recolhidas amostras de ar exalado a doentes com insuficiência renal em estádios intermédios para analisar a existência destes ou de outros picos e, caso existam, fazer uma comparação de valores de intensidade.

Uma vez terminada a recolha das amostras iniciou-se o tratamento e análise dos resultados. Tal como mencionado anteriormente, para se realizarem as análises espetais recorreu-se aos *softwares* LAV e VOCInspect.

5.1.1. Análise dos espectros do grupo de controlo e do grupo de hemodiálise

Visualizando-se os vários espectros obtidos antes do tratamento de hemodiálise verifica-se a presença de vários picos. Embora alguns destes picos possam estar ligados à patologia renal em estudo, outros certamente poderão ser provenientes de fontes exógenas e de contaminação pelo ar circundante. Uma vez que o ar da sala pode entrar pelo tubo do espirómetro, os espectros obtidos podem conter informações provenientes do ar ambiente e, deste modo, foram realizadas análises ao ar da sala para comparação entre os espectros obtidos.

Com base na análise dos espectros provenientes do grupo de controlo e do grupo em hemodiálise foram selecionados seis picos. Estes picos encontram-se representados na figura 5.1 e, a sua escolha deveu-se ao facto de serem os picos que mais variam entre estes dois grupos. Nestes seis picos estão incluídos a acetona e o isopreno, que embora sejam picos característicos dos espectros de ar exalado humano apresentaram diferenças significativas no

valor de intensidade pelo que se decidiu incluí-los. Os seis picos não se verificaram consistentes em todos os espectros, ou seja, apesar de ser os que mais diferiam entre os espectros do grupo saudável e do grupo em hemodiálise não se verificou existir uma clara tendência de picos que aparecessem em todos os espectros de um grupo e no outro grupo se encontrassem ausentes. Esta variabilidade existente, levou a que se recorresse ao *Init Dynamic PCA*, um *plug-in* existente no software LAV que faz uma análise dos componentes principais para investigar os perfis de ar exalado do grupo de doentes em hemodiálise e do grupo saudável de controlo.

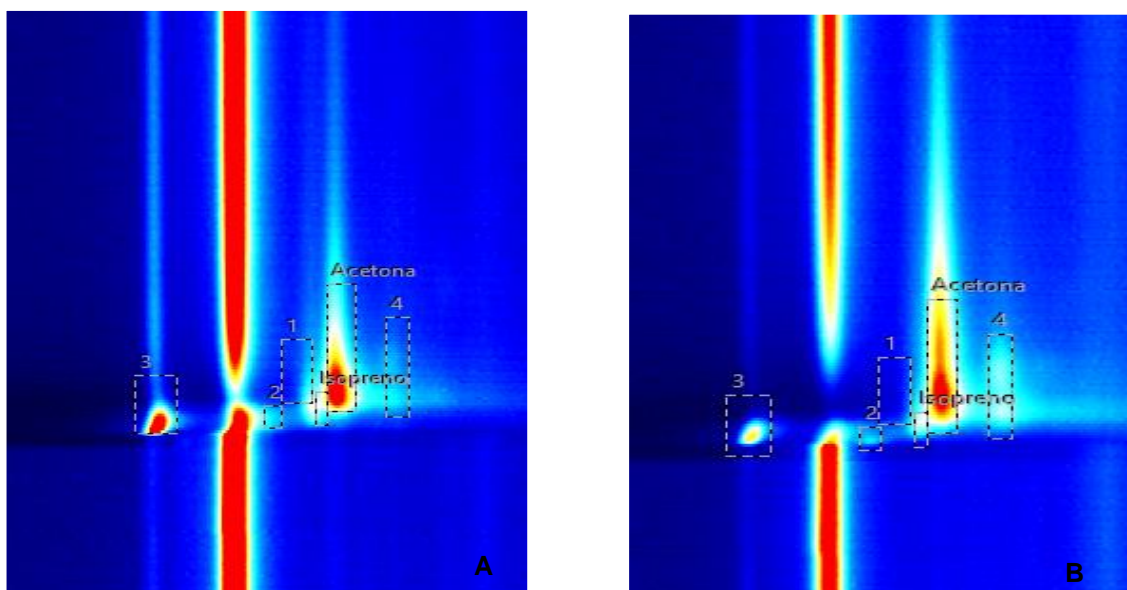


Figura 5.1 – Espectros com Identificação do *Areaset*, onde são visíveis a acetona e o isopreno que são substâncias já conhecidas e quatro picos desconhecidos, numerados de 1 a 4. **A)** Imagem do espectro do ar exalado de um participante pertencente ao grupo de controlo. **B)** Imagem do espectro do ar exalado do paciente H12 pertencente ao grupo de hemodiálise.

A análise PCA permite determinar uma correlação entre os diferentes picos selecionados, o que pareceu ser a melhor abordagem nesta situação. Os resultados obtidos demonstraram que existe uma clara separação entre a informação contida nos espectros de ar exalado dos pacientes em hemodiálise e dos colaboradores que constituíram o grupo de controlo.

Pelos resultados obtidos através da análise PCA verifica-se que nos pacientes que sofrem de insuficiência renal crónica ocorrem alterações metabólicas que inevitavelmente conduzem à produção de certos metabolitos anormais ou, em quantidades diferentes das existentes em pessoas saudáveis. É importante referir que o primeiro componente representa, aproximadamente, 81% da variância total e o segundo componente 9%. Juntos são responsáveis por 90% da variância. Analisando a figura 5.2 verifica-se que o grupo de controlo apresenta uma variação global superior quando comparado ao grupo de pacientes em hemodiálise, o que era expectável visto que os pacientes com IRC apresentam características muito semelhantes entre si.

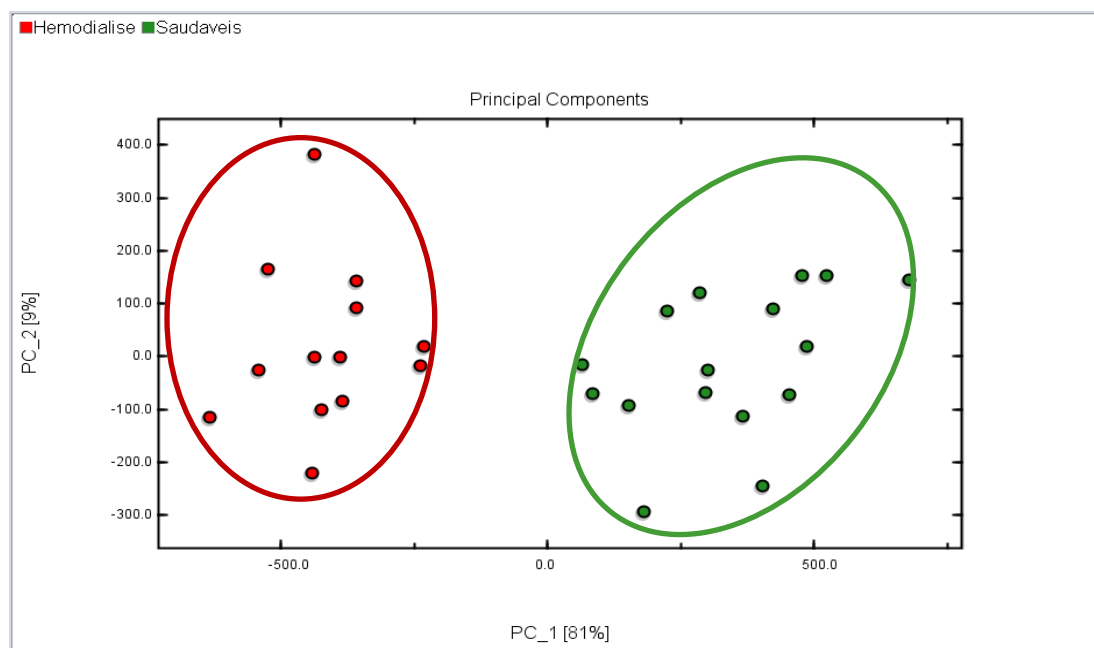


Figura 5.2 – Imagem do gráfico resultante da análise PCA. A vermelho encontram-se os dados referentes aos pacientes em hemodiálise. A verde, os dados são respeitantes aos valores provenientes dos espectros do grupo de controlo.

5.1.2. Análise dos espectros do grupo de doentes em Hemodiálise - recolha antes e após o tratamento

Como referido no capítulo 4, foram recolhidas amostras de ar exalado de 13 pacientes em hemodiálise, antes e após o tratamento. Durante as análises ao ar exalado foram recolhidas, sempre que possível, amostras ao ar ambiente utilizando o mesmo método para comparação entre os espectros obtidos. A realização de análises ao ar ambiente presente no local onde é efetuada a recolha das amostras de interesse propriamente ditas, neste caso amostras de ar exalado provenientes de pacientes com IRC, permite eliminar o *background* do ar da sala.

Analisando os espectros obtidos, são notórias diferenças entre os espectros obtidos antes e após o tratamento. Por exemplo, para um mesmo paciente verifica-se o aparecimento de novos picos após a hemodiálise e, alterações na intensidade de picos que já existiam anteriormente. O aparecimento de novos picos pode estar relacionado com a libertação de compostos orgânicos voláteis por parte do equipamento de hemodiálise ou ser consequência da medicação administrada aos doentes no decorrer do tratamento.

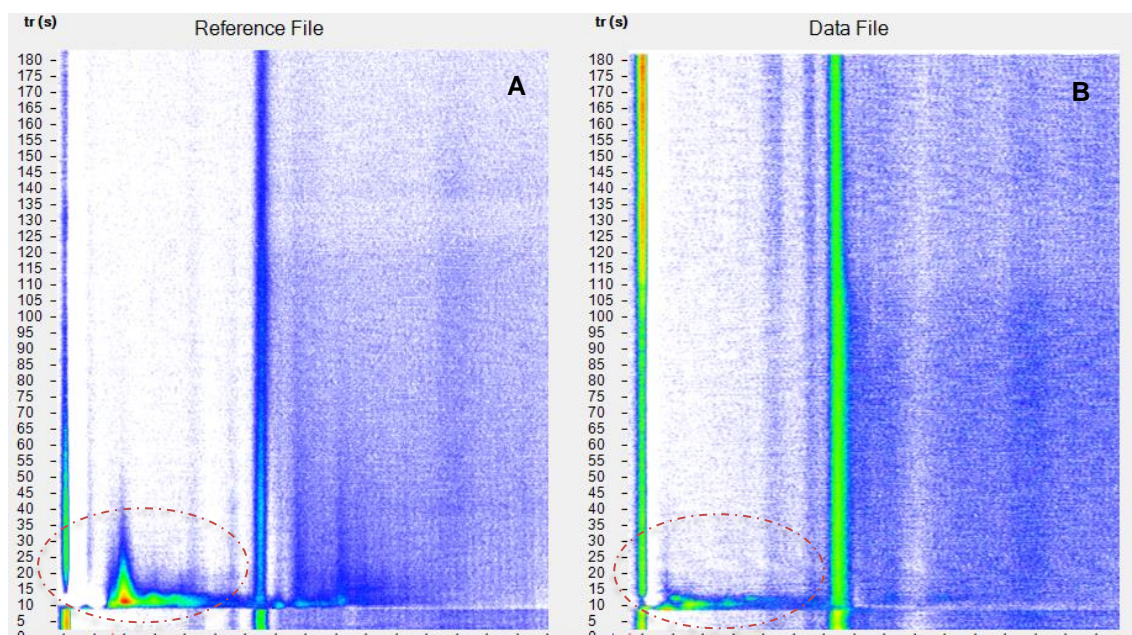


Figura 5.3 – A) Imagem da subtração do espectro do ar da sala ao espectro do ar exalado do paciente H07, no período antes de iniciar o tratamento de hemodiálise, com delimitação da área de interesse. **B)** Imagem da subtração do espectro do ar da sala ao espectro do ar exalado do paciente H07, no período após terminar o tratamento de hemodiálise, com delimitação da área de interesse.

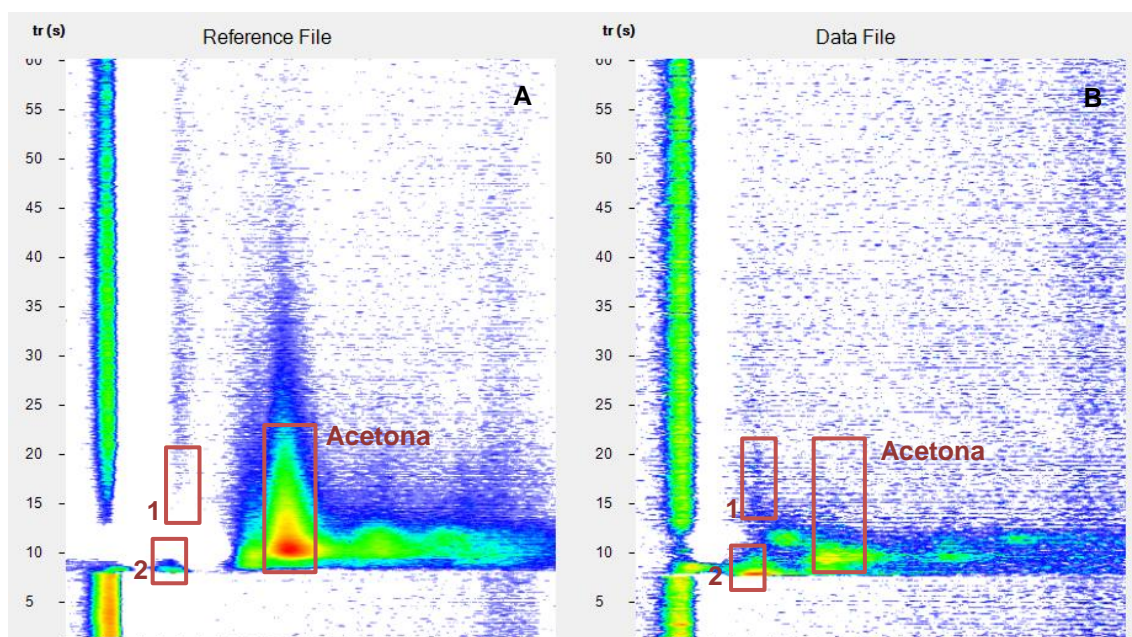


Figura 5.4 – Imagem resultante da figura 5.3 pela aplicação de *zoom* à zona de interesse. **A)** Imagem da subtração do espectro do ar da sala ao espectro do ar exalado do paciente H07, no período antes de iniciar o tratamento de hemodiálise, com marcação dos picos de interesse. **B)** Imagem da subtração do espectro do ar da sala ao espectro do ar exalado do paciente H07, no período após terminar o tratamento de hemodiálise, com marcação dos picos de interesse.

Feita uma análise mais cuidadosa, foram identificados dois picos que são mais evidentes nos espectros recolhidos após o tratamento de hemodiálise. Para além destes dois picos

desconhecidos foi também considerado o pico de acetona devido às diferenças de intensidade apresentadas antes e após o tratamento de hemodiálise. A acetona já tinha sido apontada em estudos anteriores, realizados com a técnica SIFT-MS, como sendo um dos compostos que sofria alterações dos valores de intensidade com o tratamento de hemodiálise pelo que, se verificou se tal acontecia também usando a técnica analítica MCC-IMS. Estes três picos compõem o *Areaset* e podem estar relacionados com a prática de hemodiálise pelo que foram alvo de análise. Para a identificação destes picos foi realizada uma análise profunda a todos os espectros e depois de definido o *Areaset* no LAV foi reavaliada a presença dos mesmos em todos os espectros, uma vez que, para baixos tempos de retenção há maior contaminação por parte de outros compostos. Concluída a análise verificou-se que o pico 1 e 2 apresenta maior intensidade após a hemodiálise e a acetona apresenta uma diminuição da intensidade após o tratamento para quase todos os pacientes estudantes.

Nas figuras 5.3 e 5.4 são apresentados dois espectros de um mesmo colaborador, antes e após realizar o tratamento de hemodiálise, onde são evidentes as diferenças de intensidade destes três picos após o tratamento de hemodiálise. Os espectros apresentados nas figuras 5.3 e 5.4 são o resultado da subtração do espectro do ar ambiente recolhido no momento da análise ao espectro resultante da recolha do ar exalado, antes e após o tratamento. Esta subtração, feita com recurso ao *software* VOCInspect, permitiu evidenciar os picos provenientes do ar exalado de cada paciente ao subtrair as contaminações provenientes do ar da sala.

Para se estudar as diferenças de intensidade dos picos identificados na figura 5.4 antes e após a hemodiálise construíram-se gráficos recorrendo à ferramenta Kaleidagraph®, para mais fácil comparação. O valor de intensidade de cada pico foi obtido usando-se a funcionalidade *Analyze Areaset* disponível no LAV que permite obter diversos dados para os picos selecionados no *Areaset*. Nas figuras 5.5 e 5.6 encontram-se representadas as intensidades, em volts, para o pico 1 e 2, respetivamente. Analisando o gráfico presente na figura 5.5 verifica-se que a intensidade do pico 1 aumenta em todos os pacientes após o tratamento de hemodiálise. Nos pacientes H01, H02 e H03 a alteração do valor de intensidade é praticamente nula mas, tal pode dever-se às condições a nível do equipamento em que estes voluntários realizaram a análise do ar exalado. Estes três pacientes fizeram análises ao ar exalado no mesmo dia e, neste dia, o BreathSpec® possuía um RIP com um valor de intensidade a rondar 1.2 V, qual se trata de um valor bastante baixo, o que pode ter condicionado o aparecimento de compostos no espectro resultante.

Relativamente ao pico 2, à semelhança do que se verificou com o pico 1 também este registou um aumento da intensidade após o tratamento de hemodiálise. Contudo, neste caso verificam-se duas exceções que são o colaborador H07 e H13, cujos valores de intensidade decresceram após a realização da hemodiálise. As diferenças registadas nas intensidades do pico 2 para os pacientes H07 e H13 não se conseguem explicar, pelo que seria útil de futuro repetir as análises nestes doentes a fim de se verificar se ocorrem diferenças.

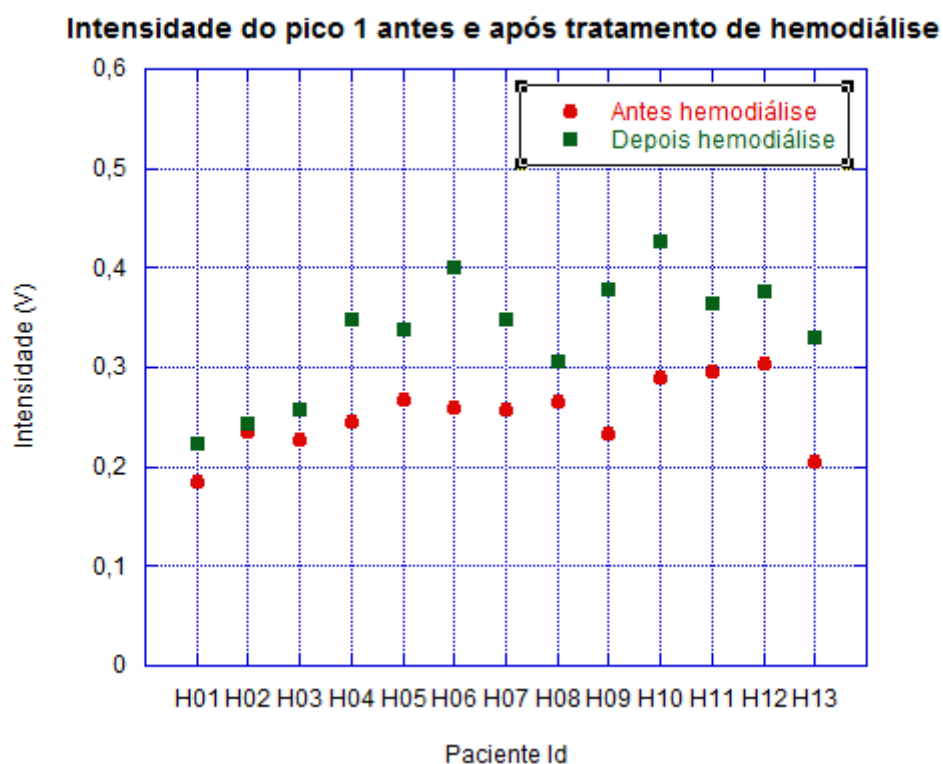


Figura 5.5 - Gráfico da variação de intensidade do Pico 1, em cada um dos espectros do grupo de pacientes em hemodiálise, antes e após o tratamento.

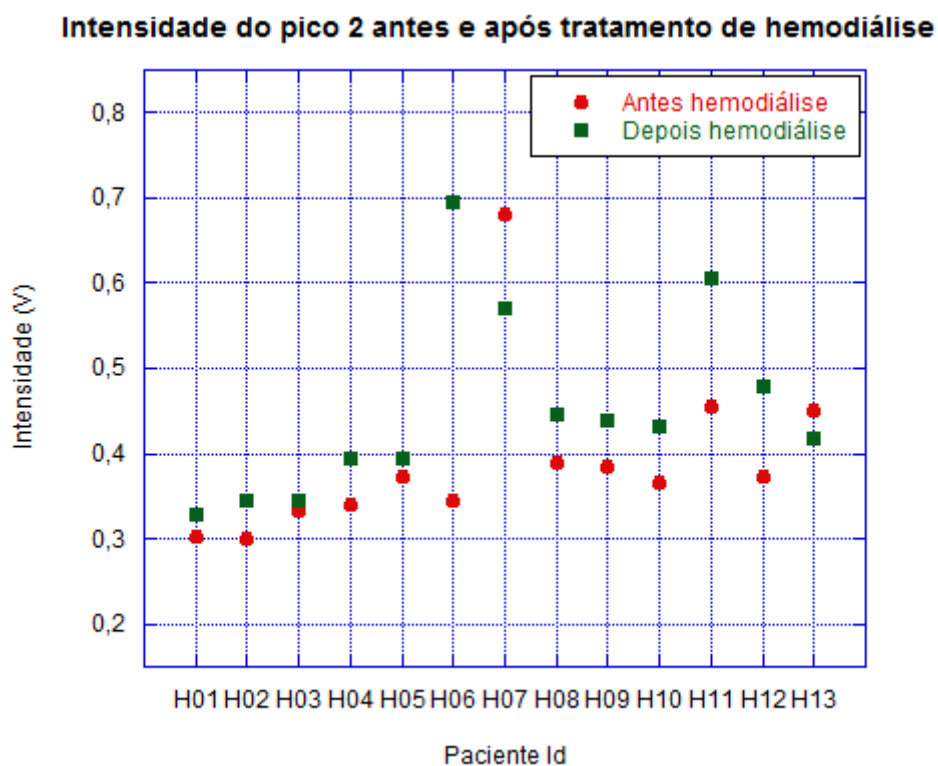


Figura 5.6 - Gráfico da variação de intensidade do Pico 2, em cada um dos espectros do grupo de pacientes em hemodiálise, antes e após o tratamento.

Por fim, uma vez que existem estudos realizados com outras técnicas analíticas que sugerem que após o tratamento de hemodiálise a intensidade de acetona diminui, foi estudada esta possibilidade. Os resultados encontram-se na figura 5.7.

À semelhança do que se verificou em estudos anteriores, também estes dados sugerem que após o tratamento de hemodiálise o valor de intensidade da acetona diminui. De novo se verifica que os pacientes H01, H02 e H03 são os que se apresentam uma menor variação que pode ser devida às condições de aquisição das amostras do ar exalado, como foi referido anteriormente. Quanto ao paciente H11, este não foi considerado para a análise do pico de acetona pois ocorreu saturação do RIP e não houve formação do pico da acetona. Quando ocorre saturação do RIP deixam de estar disponíveis mais iões reativos para interagir com a amostra e, portanto vão aparecer no espectro, primeiramente, os picos pertencentes a compostos cujo valor de afinidade protónica seja superior, até que se esgotem os iões reativos disponíveis. O paciente H12 registou um aumento de acetona após o tratamento cujas causas não se conseguiram apurar.

Intensidade do pico de acetona antes e após tratamento de hemodiálise

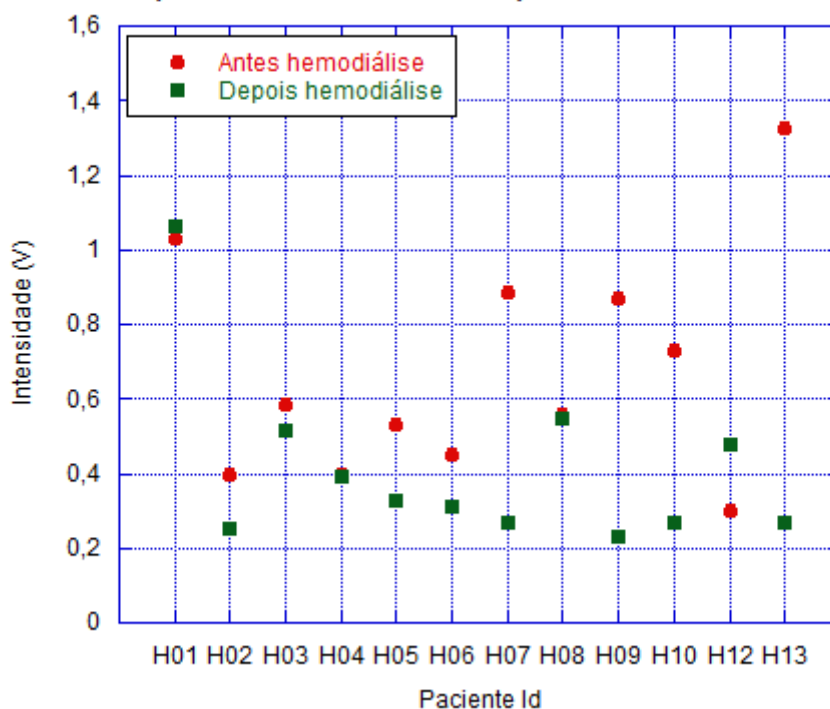


Figura 5.7 - Gráfico da variação de intensidade do pico de acetona, em cada um dos espectros do grupo de pacientes em hemodiálise, antes e após o tratamento.

5.1.3. Análise dos espectros do grupo de controlo e do grupo em estágio intermédio

Finalizada a recolha do ar exalado dos 14 colaboradores em estágio intermédio que compôs a amostra realizou-se a análise dos espectros. À semelhança do que aconteceu

aquando das recolhas de ar exalado das amostras já anteriormente abordadas, também nos dias em que foram recolhidas amostras aos pacientes em estádios intermédios foram efetuadas análises sistemáticas ao ar ambiente.

Os espectros provenientes de pacientes em estádios intermédios foram analisados e comparados com os espectros da população saudável de controlo. Verificou-se a presença de determinados picos em alguns dos espectros provenientes de colaboradores em estágio intermédio que não se verificaram nos espectros provenientes do grupo de controlo, como está apresentado na figura 5.8. Apesar de existirem alguns picos diferentes nos espectros dos colaboradores em estádios intermédios não é possível dizer se estes estão, ou não, relacionados com a insuficiência renal uma vez que não existe total concordância entre os espectros obtidos. Uma possível justificação para a ocorrência destes picos unicamente em alguns espectros da população com insuficiência renal tem a ver com a elevada dose de medicação que estes pacientes tomam e que podem originar picos nos espectros de ar exalado relacionados com a libertação de compostos provenientes da medicação. Não foi possível obter mais informações sobre a posologia aplicada em cada paciente uma vez que esta é bastante variável de doente para doente, em dose e aplicabilidade. Estes doentes para além da insuficiência renal possuem muitas outras patologias como diabetes, colesterol e hipertensão que requerem medicações específicas para cada paciente e podem influenciar os picos que aparecem nos espectros.

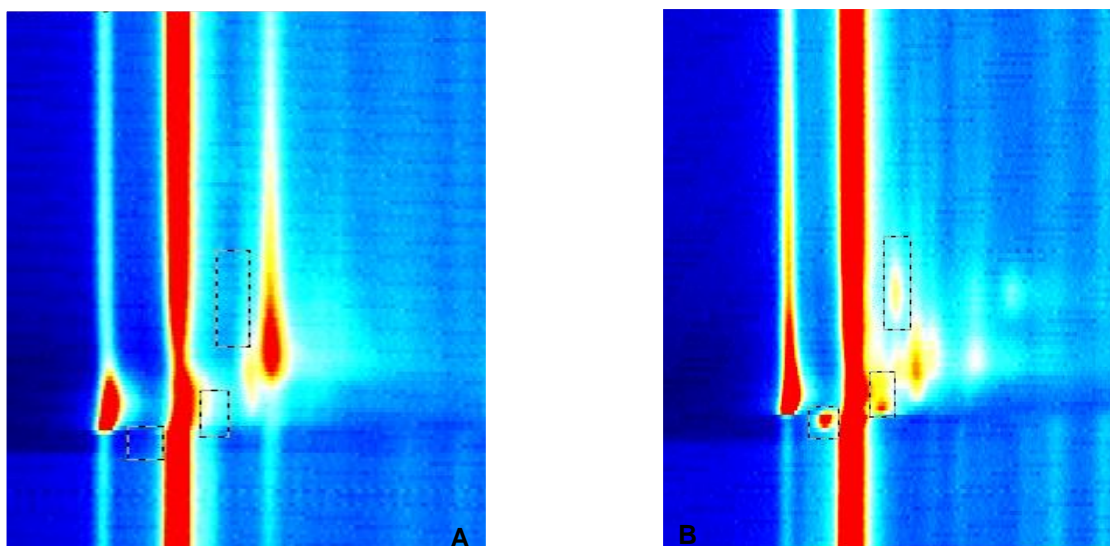


Figura 5.8 –A) Imagem do espectro do ar exalado de um participante do grupo de controlo, com marcação dos picos de interesse. **B)** Imagem do espectro do ar exalado do paciente I13 com insuficiência renal em estágio intermédio, com marcação dos picos de interesse.

Ainda relativamente aos espectros provenientes dos colaboradores em estádios intermédios, os pacientes I07, I11, I13 e I14 revelaram a presença do pico 1 referido acima,

quando foram estudadas as diferenças entre os espectros do ar exalado de pacientes em hemodiálise, antes e após o tratamento. Como foi referido anteriormente, estes espectros são o resultado de análises ao ar exalado de pacientes com DRC3 e DRC4. O aparecimento do pico 1 pode estar relacionado com o nível de progressão da insuficiência renal, contudo, quando se tentou estabelecer uma relação com os valores da taxa de filtração glomerular fornecidos pelos colaboradores do hospital não se verificou existir qualquer tendência.

5.2. Cálculo da Mobilidade Reduzida

Por fim, terminada a análise espectral calculou-se para os picos encontrados, pico 1 e pico 2, o valor de mobilidade iónica reduzida.

Para o cálculo da mobilidade iónica (K) e mobilidade iónica reduzida (K_0) recorreu-se às equações apresentadas abaixo e retratadas no capítulo 3. A equação 5.1 foi usada para calcular a mobilidade iónica, e a equação 5.2 para o cálculo da mobilidade iónica reduzida.

$$K = \frac{l_d}{Et_{dcor}} \quad (5.1)$$

Onde:

l_d : comprimento do tubo de deriva = 5cm

E : intensidade do campo elétrico = 400 V cm⁻¹

t_{dcor} : correção do tempo de deriva - $t_{dcor} = t_d - 0,5 \times \Delta\tau$, sendo t_d o tempo de deriva e $\Delta\tau$ o tempo de abertura da grelha = 100 µs.

$$K_0 = K \left(\frac{P_d}{P_0} \right) \left(\frac{T_0}{T_d} \right) \quad (5.2)$$

Onde:

P_0 : Pressão ambiente = 101325 Pa

T_0 : Temperatura ambiente = 273 K

P_d : Pressão no tubo de deriva = 101000 Pa

T_d : Temperatura no tubo de deriva = 313 K

Na tabela 5.1 são apresentados os valores calculados para a mobilidade iónica e mobilidade iónica reduzida relativas ao pico 1 e 2, bem como os correspondentes valores de tempo de deriva (t_d) e de tempo de retenção (t_r).

Tabela 5.1 - Mobilidade iónica reduzida (K_0) para os picos 1 e 2 detetados, bem como o tempo de deriva (t_d) e de retenção (t_r).

	t_d (ms)	t_r (s)	K ($\text{cm}^2\text{V}^{-1}\text{s}^{-1}$)	K_0 ($\text{cm}^2\text{V}^{-1}\text{s}^{-1}$)	$1/K_0$ (cm^2Vs)
Pico 1	8,110	10,836	1,551	1,353	0,740
Pico 2	7,959	7,434	1,580	1,379	0,725

Como já foi referido anteriormente a maior limitação desta técnica é, atualmente, a identificação dos compostos. Após consulta da literatura não se conseguiu encontrar substâncias com parâmetros semelhantes aos encontrados pelo que não foi possível a identificação dos compostos.

5.3. Verificação do pico da Amónia

A bibliografia sugere uma forte correlação entre a insuficiência renal e a presença de amónia nos espectros de pacientes cuja incidência da doença se faça notar. Ainda, com recurso à literatura, é espectável que o pico da amónia surja antes do RIP, com o valor de mobilidade reduzida já identificado igual a $2,06 \text{ cm}^2\text{V}^{-1}\text{s}^{-1}$. [60]

Tendo por base a relevância da amónia neste estudo, optou-se por analisar a amónia tentando estabelecer uma curva de calibração e identificação do seu pico característico. A amónia utilizada foi uma solução aquosa a 25 %, de peso molecular $35,04 \text{ g mol}^{-1}$ e densidade $0,91 \text{ g cm}^{-3}$.

Com este objetivo, fizeram-se diluições consecutivas de hidróxido de amónia em água pura, apresentando-se na tabela 5.2 as concentrações finais encontradas e que foram alvo de análise. Para a análise das diferentes concentrações de amónia colocou-se a amostra de duas formas distintas. No primeiro caso pipetou-se, para cada concentração, uma quantidade de 0,05 mL de amónia diluída num frasco, encerrando-se, posteriormente, os mesmos. Em seguida, repetiu-se este procedimento mas colocando uma compressa esterilizada por cima de cada amostra de amónia, fechando, de seguida, cada frasco.

Tabela 5.2 – Concentrações de amónia analisadas.

Amostra	Concentração (ppm)
1	138
2	253
3	433
4	549
5	674

A aquisição dos espetros foi feita pelo aparelho MCC – IMS, que tem por base o mesmo princípio de espectrometria de mobilidade iónica. Definiu-se um programa no MCC – IMS semelhante ao utilizado para a recolha das amostras de ar exalado no BreathSpec® cujas características são apresentadas na tabela 5.3.

Tabela 5.3 – Programa BREATH_5M implementado no MCC - IMS definido para os procedimentos de análise das amostras de amónia.

Spectra	Time	V	P	R	E1	E2	T1	T2	S
0	0 ms			Rec					
1	126 ms		25%						
16	2.016 s	open	off						
40	5.040 s	close							
1425	03m 00s			Stop					
1426	03m 00s	-	-	-	-	-	-	-	-

Este aparelho, à semelhança do BreathSpec®, apresenta uma entrada para a amostra denominada *Sample*. Para a análise colocou-se o frasco com a amostra de amónia e fez-se a ligação ao MCC - IMS através de uma agulha, havendo um período de espera, de 5 minutos, antes de se iniciar a análise para estabilização do *headspace*. A montagem deste procedimento de análise pode ser visualizada abaixo, na figura 5.9.

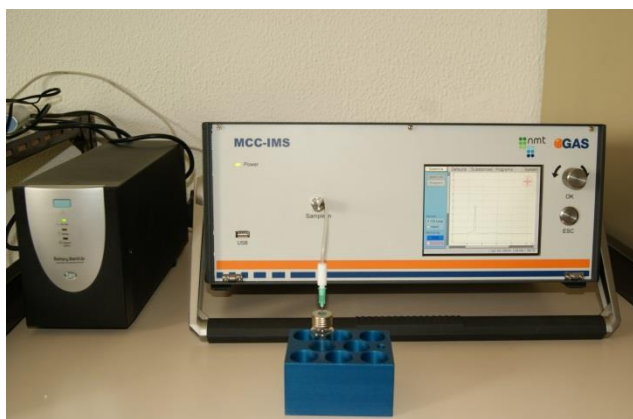


Figura 5.9 – Imagem do equipamento MCC - IMS no processo de recolha da amónia (Imagem obtida em laboratório).

Iniciou-se a análise das amostras pelas de concentrações inferiores progredindo para valores superiores, a fim de evitar-se o fenómeno de saturação. Como *background* fizeram-se medições, em iguais condições, de um frasco vazio e de um frasco com compressa esterilizada, não contendo qualquer amostra. Estas foram as duas primeiras medições realizadas e podem ser vistas na figura 5.10.

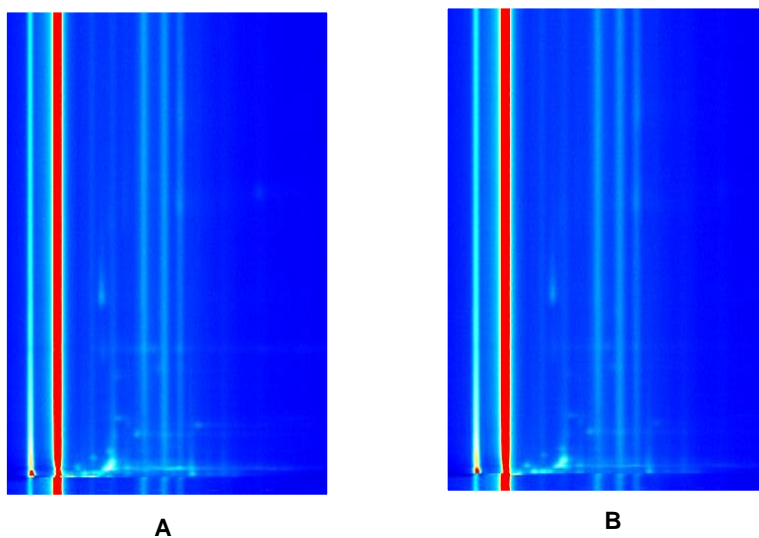


Figura 5.10 – A) Imagem do espectro de análise do frasco vazio. **B)** Imagem do espectro de análise ao frasco contendo uma compressa esterilizada.

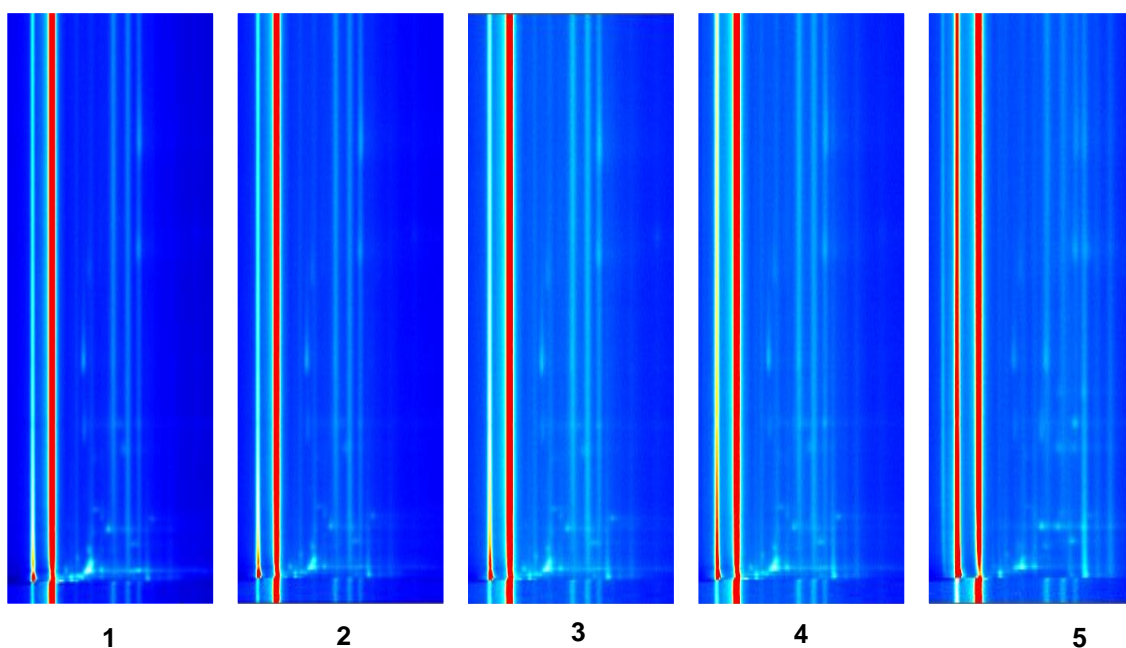


Figura 5.11 – Imagens dos espectros de análise da amostra de amónia para as 5 soluções com as diferentes concentrações apresentadas na tabela 5.2. Os espectros apresentados encontram-se numerados de 1 a 5, tendo em conta, a solução de amónia que deu origem ao espectro.

Seguidamente, iniciou-se a recolha para as diferentes concentrações de amónia, seguindo-se o protocolo previamente descrito. Os espectros obtidos das amostras simples e com compressa são apresentados na figura 5.11 e 5.12, respetivamente.

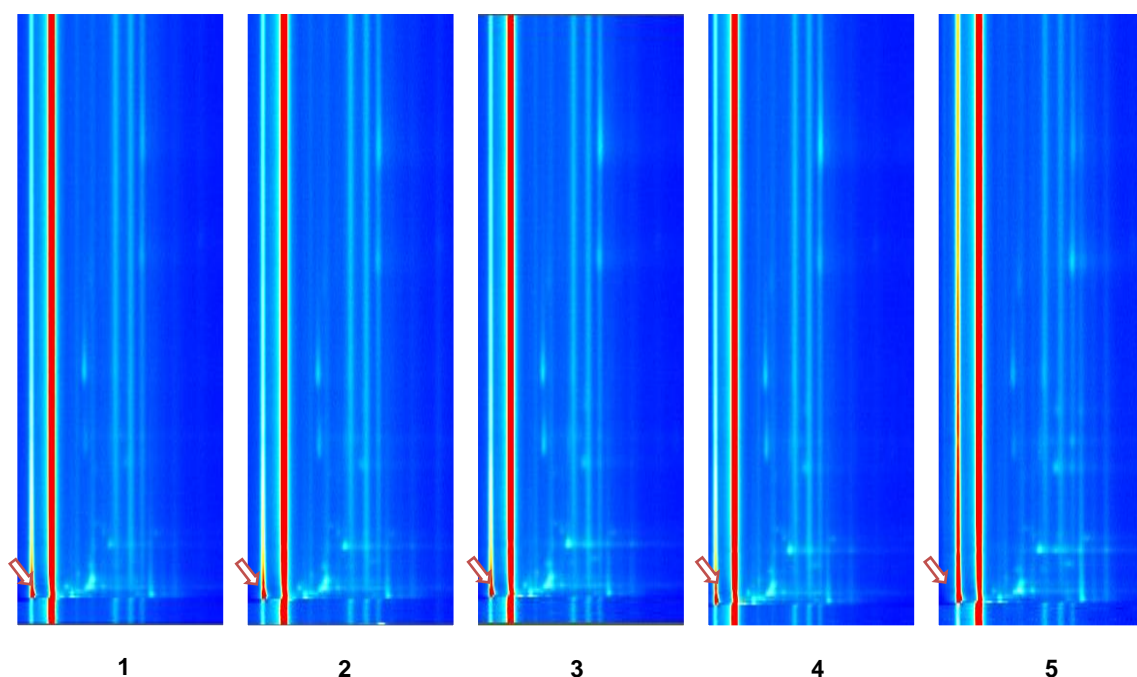


Figura 5.12 - Imagens dos espectros de análise da amostra de amónia embebida numa compressa para as 5 soluções com as diferentes concentrações apresentadas na tabela 5.2. Os espectros apresentados encontram-se numerados de 1 a 5 consoante a solução de amónia que deu origem ao espectro.

Numa primeira observação aos espectros obtidos é possível identificar-se diversos picos. No entanto, atentando à figura 5.10, verifica-se que certos picos são provenientes dos materiais do qual é constituído o frasco que contem a amostra uma vez que estes também se encontram nestes espectros, onde a amónia não está presente. De qualquer forma, fazendo uma análise visual simples às figuras 5.11 e 5.12, verifica-se que para todos os espectros analisados, com e sem compressa, ocorre um aumento de intensidade de um pico situado à esquerda do RIP com o aumento da concentração de amónia. Desta forma, suspeita-se que este pico poderá ser o de amónia. Para confirmar que este poderá ser o pico de amónia e fazer uma avaliação dos restantes picos, recorreu-se posteriormente ao *software* VOCInspect e fez-se a subtração dos espectros da figura 5.11 com o espectro do frasco vazio, e os espectros da figura 5.12 com o do frasco com a compressa.

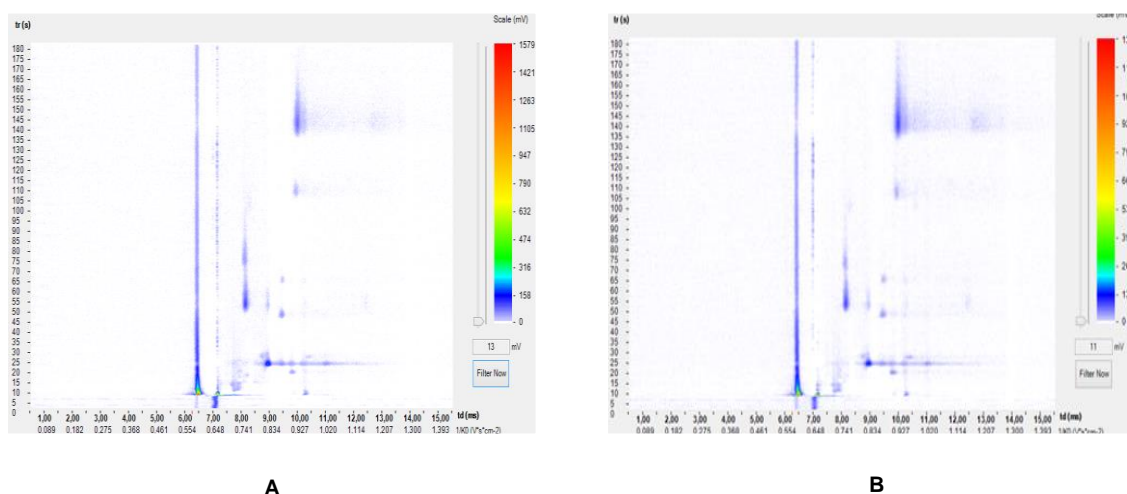


Figura 5.13 – A) Imagem da subtração do espectro do frasco vazio com compressa ao espectro resultante da análise da amostra 3 de amónia embebida numa compressa. **B)** Imagem da subtração do espectro do frasco vazio com compressa ao espectro resultante da análise da amostra 4 de amónia embebida numa compressa.

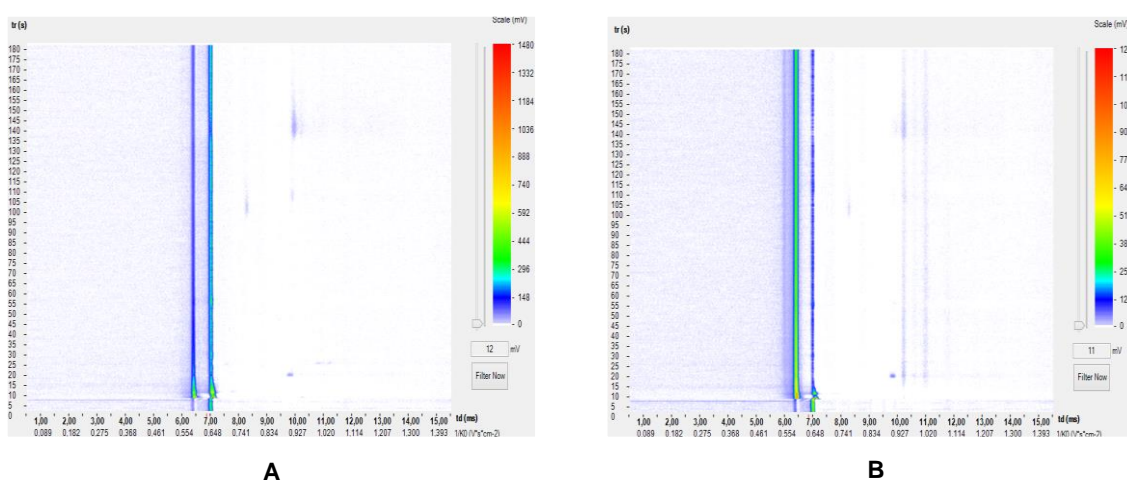


Figura 5.14 – A) Imagem da subtração do espectro do frasco vazio ao espectro resultante da análise da amostra 3 de amónia. **B)** Imagem da subtração do espectro do frasco vazio ao espectro resultante da análise da amostra 4 de amónia.

Analisando as figuras 5.13 e 5.14 embora sejam notórias diferenças aquando da utilização ou não da compressa, havendo um maior número de picos quando esta se encontra presente, é visível a presença de alguns picos em ambas as amostras. Em particular destaca-se o pico apontado como sendo o de amónia e que pode ser visto com mais detalhe na figura 5.15.

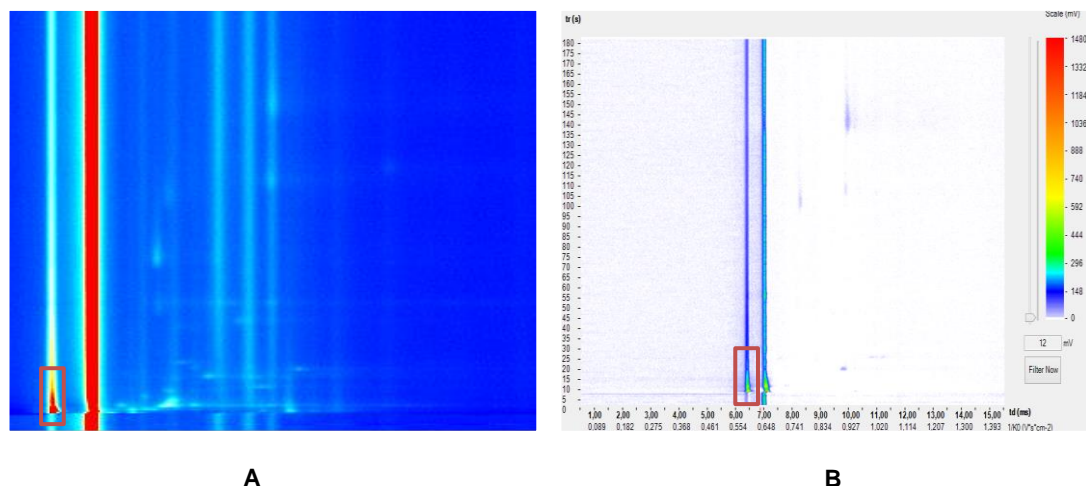


Figura 5.15 – A) Imagem do espectro da análise da amostra 3 de amónia, recorrendo ao *software* LAV. A vermelho é delimitado o pico correspondente a esta substância. **B)** Imagem resultante da subtração do espectro do frasco vazio ao espectro resultante da análise da amostra 4 de amónia, recorrendo ao *software* VOCInspect. A vermelho é delimitado o pico correspondente a esta substância.

Identificado o pico da amónia procedeu-se ao cálculo da mobilidade reduzida, que se encontra na tabela 5.4. O valor de mobilidade iónica experimentalmente obtido é um pouco inferior ao encontrado na literatura. O pico de amónia surge nos espectros como *cluster* com o pico relativo à água, o que torna difícil a sua separação levando a medições incorretas do tempo de deriva e retenção. Esta diferença de 0,35V, no valor de mobilidade iónica reduzida da amónia, calculado experimentalmente, em relação ao valor de referência pode dever-se a uma má determinação do tempo de deriva que, consequentemente, influenciou o valor de K_0 calculado.

Tabela 5.4 – Mobilidade iónica reduzida (K_0) para o pico de amónia, bem como o tempo de deriva (t_d) e de retenção (t_r).

t_d (ms)	t_r (s)	K ($\text{cm}^2\text{V}^{-1}\text{s}^{-1}$)	K_0 ($\text{cm}^2\text{V}^{-1}\text{s}^{-1}$)	$1/K_0$ (cm^{-2}Vs)
6,422	8,694	1,96171	1,71101	0,58445

Comparando os espectros resultantes da análise da amónia com os do grupo de pacientes em hemodiálise e em estádios intermédios não se verificam semelhanças. Em nenhum dos espectros analisados se verifica a existência de forma clara do pico de amónia, como era expectável.

5.4. Comparação entre os filtros

Neste trabalho a recolha das amostras foi feita com recurso a um filtro usado no equipamento *Biopac*, ao contrário do que aconteceu com o estudo anterior cujos filtros usados foram da marca *Intersurgical*. Neste sentido e, como os resultados obtidos se revelaram diferentes dos esperados, ou seja, diferentes dos obtidos na prova de conceito que precedeu este estudo foram realizadas análises a fim de se compararem ambos os filtros. Fizeram-se vários tipos de ensaios com um mesmo colaborador em condições iguais e, com repetição em dias diferentes.

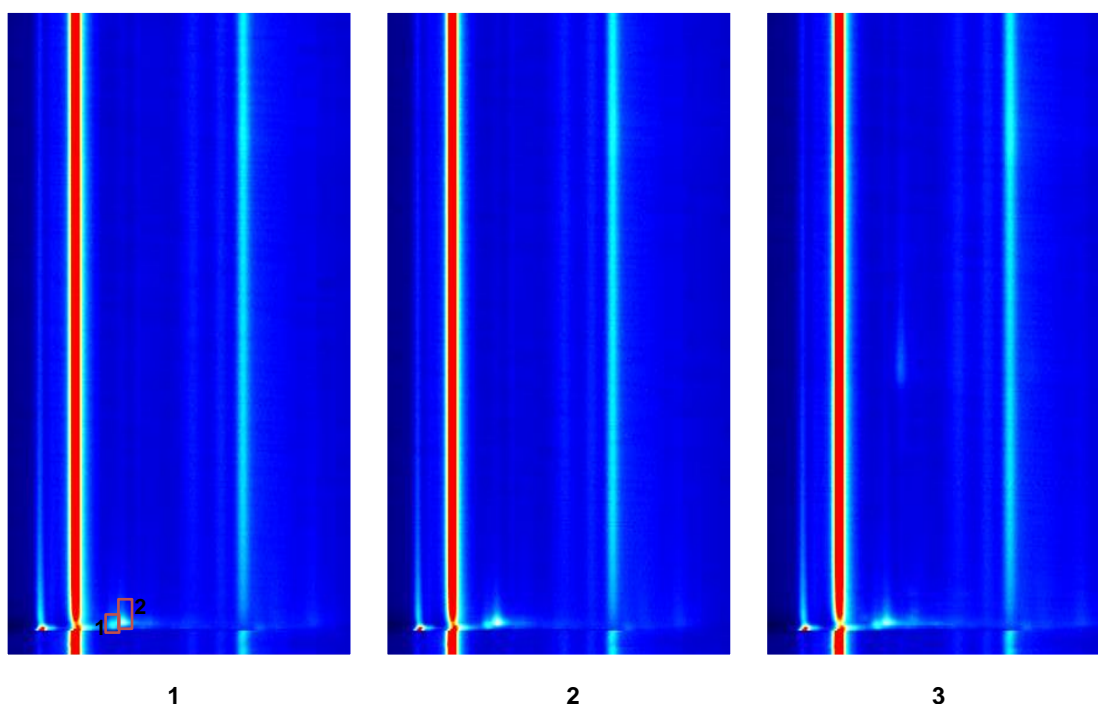


Figura 5.16 – 1) Imagem do espectro do ar exalado de um colaborador onde não foi usado filtro. A vermelho encontra-se delimitado o pico do isopreno (1) e o da acetona (2). **2)** Imagem do espectro do ar exalado de um colaborador em que na recolha foi usado um filtro *Biopac*. **3)** Imagem do espectro do ar exalado de um colaborador em que na recolha foi usado um filtro da marca *Intersurgical*.

Na figura 5.16 encontram-se três espectros de um mesmo sujeito, obtidos simultaneamente e em iguais circunstâncias, diferindo apenas no tipo de filtro usado. Atentando aos espectros, facilmente se verifica a presença de picos adicionais quando foi usado o filtro da *Intersurgical* que não aparecem presentes nos outros casos. Quanto aos espectros obtidos sem a utilização de qualquer filtro e com o filtro *Biopac* os resultados revelaram-se sempre muito similares. Verificou-se que para filtros diferentes a informação relativa ao número de picos que daí advém pode sofrer alterações. Seguidamente verificou-se qual a sua influência na intensidade dos picos. Para tal, comparou-se para os três casos os valores de intensidade do isopreno e

acetona, que são dois compostos facilmente identificados com a técnica de espectrometria de mobilidade iónica. Os resultados encontram-se expressos na figura 5.17.

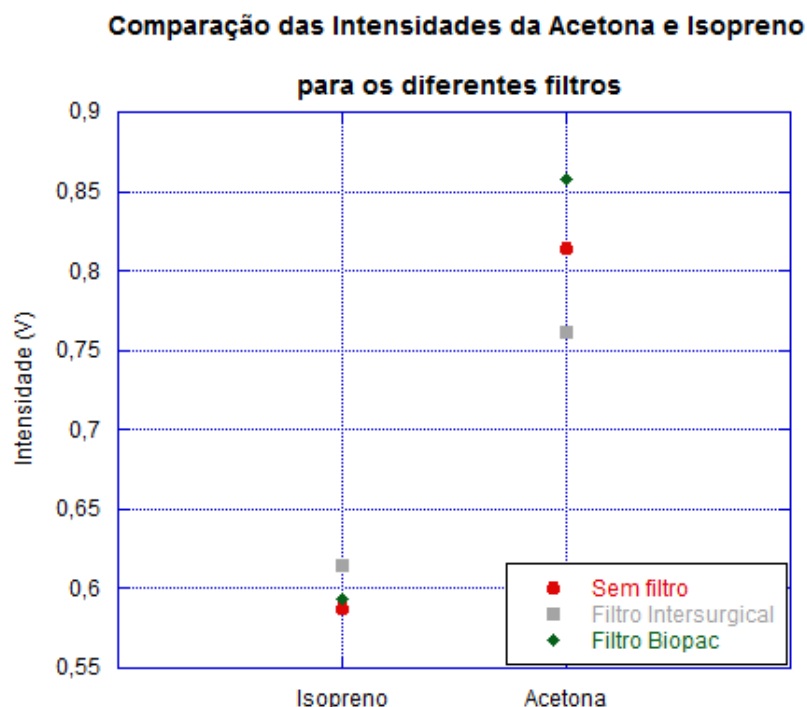


Figura 5.17 - Gráfico com os valores de intensidade da acetona e isopreno, para cada um dos diferentes tipos de filtros (sem filtro, filtro *Biopac* e filtro *Intersurgical*).

Pela observação do gráfico apresentado na figura 5.17 verifica-se que apesar dos filtros diferirem no número de compostos presentes no espetro, a intensidade dos compostos que surgem apresentam valores semelhantes, havendo uma maior variação para o pico de acetona.

Os resultados apresentados não foram únicos, e verificaram-se semelhantes quando foram realizadas outro tipo de análises. Um dos testes realizados foi o de mascar uma pastilha de mentol e seguidamente recolher uma amostra do ar exalado. Repetiu-se o mesmo procedimento mas com uma pastilha de morango. Em ambos os testes se verificou a existência de um maior número de picos no filtro da *Intersurgical* quando comparado aos outros dois (sem filtro e com filtro *Biopac*). Os espetros obtidos sem a introdução de um filtro e com o filtro do *Biopac* foram sempre bastante semelhantes, pelo que se considerou que o melhor seria ou utilizar o filtro do *Biopac* ou recolher as amostras sem qualquer filtro. Por uma questão de disponibilidade de material foi utilizado o filtro do *Biopac*, pois quando não se coloca filtro é necessária a utilização de um adaptador para fazer a ligação entre a boquilha e o espirómetro que não estavam disponíveis em número suficiente.

6 ■ Conclusões e Perspetivas Futuras

As análises ao ar exalado têm despertado cada vez mais interesse pois trata-se de um método de recolha simples e não invasivo com informações acerca do estado metabólico de cada pessoa. Existe já um vasto conjunto de compostos presentes na respiração humana com ligação a estados fisiológicos. O interesse por esta área é cada vez maior e a procura de novos compostos que possam servir de marcadores para determinada patologia levaram à realização de inúmeros estudos.

Neste sentido, com este estudo pretendia-se fazer uma análise ao ar exalado em ambiente hospitalar de doentes com problemas renais. Utilizando o BreathSpec®, cujo princípio de funcionamento se baseia na espectrometria de mobilidade iónica, foram retiradas várias amostras ao ar exalado de doentes renais em diferentes estádios da doença crónica renal. A comparação entre os espectros provenientes da população de controlo e dos doentes em hemodiálise no início do tratamento sugere diferenças ao nível das duas populações em geral. Não se conseguiu isolar nenhum pico como sendo indicativo da doença devido à variabilidade existente entre os espectros mas verificou-se, recorrendo à técnica PCA, que existem compostos presentes no ar exalado dos doentes renais diferentes dos encontrados no grupo de controlo, que decerto se encontram relacionados com a doença.

Os dados obtidos que se revelaram mais significativos estão relacionados com os espectros provenientes de doentes em hemodiálise. Verificaram-se diferenças ao nível da intensidade de três picos, quando comparados os espectros obtidos antes e após tratamento. Relativamente a dois destes picos a sua identificação não foi possível pois os valores de mobilidade iónica reduzida calculados não coincidiram com valores descritos na literatura. O outro pico é proveniente da acetona que já possui parâmetros bem definidos na literatura e, portanto, foi de fácil identificação. Como forma de melhorar e validar estes resultados, seria importante fazer-se um estudo dos compostos libertados pelo equipamento de hemodiálise para verificar se alguns dos picos encontrados pode ter origem no próprio equipamento de hemodiálise.

Outro dos objetivos iniciais deste estudo prendia-se com a validação dos picos anteriormente identificados, mas tal não foi possível uma vez que estes não surgiram de forma tão explícita nos espectros dos doentes renais quanto tinha acontecido no estudo anterior realizado pelo aluno Ricardo Alves. Uma possível justificação para tal não se ter verificado prende-se com a utilização do material de recolha utilizado. Tal como já foi referido, neste estudo, procedeu-se à recolha do ar exalado usando filtros utilizados no equipamento *Biopac*. A utilização de filtros diferentes deveria produzir os mesmos resultados, uma vez que ambos são adequados ao uso no BreathSpec®, contudo ao serem comparados os espectros resultantes

usando os dois tipos de filtros verificou-se um maior número de picos quando é utilizado o filtro da *Intersurgical*. De futuro, devem ser efetuadas novas medições utilizando-se novas cânulas bocais recentemente desenvolvidas e que não utilizam filtros a fim de se padronizarem resultados e se eliminarem picos provenientes de influências externas à análise em questão.

No decorrer do trabalho recorreu-se à técnica analítica MCC-IMS para analisar uma amostra de amónia dada a forte ligação deste composto à insuficiência renal. Como resultado obteve-se um pico de amónia bem definido, numa posição anterior ao RIP. Contudo, quando se verificaram os espectros dos doentes renais não se encontrou este pico. O facto da amónia não se encontrar nos espectros de doentes renais pode estar relacionada com a sua concentração no ar exalado. A concentração da amónia no ar exalado pode estar numa gama de valores inferiores aos limites de deteção do BreathSpec®.

No decurso deste trabalho foi submetida uma publicação para o “*Breath Analysis Summit 2013*” e efetuada uma participação, como oradora, num *workshop* intitulado “*Medical application of IMS technology for Health*”, enquadrado na Jortec Biomédica 2014 e está em preparação um artigo para publicação numa revista científica.

Como perspetivas futuras ambiciona-se que esta técnica seja um método corrente utilizado como ferramenta de diagnóstico. Em particular, espera-se que venha a ser um método de diagnóstico precoce da insuficiência renal. Neste sentido, a continuação deste estudo pode revelar-se importante, aumentando-se o número de participantes e, alargando o estudo a outros centros hospitalares, a fim de se conseguir uma melhor estatística. Inicialmente, pretendia-se recolher um número superior de análises mas tal revelou-se difícil por causa de não interferir com a logística hospitalar.

As características desta técnica, como sejam o tempo curto de análise, o baixo custo e o facto de ser não-invasiva, torna-a atrativa ao uso “rotineiro” durante uma sessão de hemodiálise. Neste estudo apenas se procedeu à recolha do ar exalado após o tratamento de hemodiálise, mas em estudos futuros seria interessante fazer a recolha durante o tratamento em períodos de tempo bem definidos para ver a progressão dos picos detetados como estando relacionados com este tratamento. De igual forma, é importante fazer-se um estudo aos materiais utilizados na prática da hemodiálise a fim de perceber se estes emitem VOCs e portanto, se algum dos picos detetados pode ser proveniente do material usado.

A principal limitação desta técnica, tal como já foi referido, está relacionada com a falta de bibliotecas de compostos. Assim, de futuro, o avanço mais importante ao nível da técnica prende-se com a criação de uma base de dados onde estejam presentes os tempos de deriva e retenção, bem como o valor de mobilidade iónica reduzida para cada composto. A existência desta informação iria ser benéfica na identificação dos diferentes picos, podendo estes, mais facilmente, ser correlacionados com determinada patologia.

Bibliografia

- [1] Leszek Paczek and Marcin Nowak, "The paradox of the 21st century – is there really an epidemic of most common killers?," *International Journal of General Medicine*, pp. 799-802, November 2011.
- [2] Vivekanand Jha, Guillermo Garcia-Garcia et al., Chronic kidney disease: global dimension and perspectives, May 31, 2013.
- [3] European Kidney Health Alliance. (2013) <http://agenda.euractiv.com/>. [Online]. <http://agenda.euractiv.com/events/alariming-rise-incidence-chronic-kidney-disease-europe-how-deal-costly-problem-93483>
- [4] SAPO Saúde. (2012, Dezembro) Doença Renal Crónica: Está em crescimento e pode afetar 800 mil portugueses.
- [5] National Kidney Foundation. Sobre Insuficiência Renal Crônica - Guia para Pacientes e Familiares.
- [6] National Institutes of Health, National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases, 2013 USRDS annual Data Report - Atlas of Chronic Kidney Disease in The United States, 2013.
- [7] Carla Rodrigues. (2009, Março) Médicos de Portugal. [Online]. http://medicosdeportugal.saude.sapo.pt/utentes/doencas_urológicas/doenca_renal_cronica_um_em_cada_10_portugueses_sofre_de_doenca_renal_cronica
- [8] Sónia Trigeirão, "800 mil sofrem de doença renal," *Correio da Manhã*, Dezembro 2012.
- [9] Fresenius Medical Care. (2012, Março) CARTA ABERTA ao Senhor SECRETÁRIO de ESTADO ADJUNTO do Ministro da Saúde.
- [10] (2012, Agosto) www.pop.eu.com. [Online]. www.pop.eu.com
- [11] M. J. Navas, A. M. Jiménez, and A. G. Asuero, "Human biomarkers in breath by photoacoustic spectroscopy," *Clinica Chimica Acta*, pp. 1171-1178, Abril 2012.
- [12] J. Stach and J. I. Baumbach, "Ion Mobility Spectrometry - Basic Elements and Applications," *Int j Ion Mobility Spectrom*, pp. 1-21, 2002.
- [13] W. Vautz, J. Nolte, R. Fobbe, and J. I. Baumbach, "Breath analysis - performance and potential of ion mobility spectrometry," *Journal of Breath Research*, pp. 1-8, Julho 2009.
- [14] Gerard J. Tortora, *Corpo Humano - Fundamentos de Anatomia e Fisiologia*, 4th ed.: Artmed Editora - Edição Universitária, 2001.
- [15] Rod R. Seeley, Trent D. Stephens, and Tate Philip, *Anatomia & Fisiologia*, 6th ed.: Lusociência - Edições técnicas e científicas, Lda, 2003.
- [16] Rodney A. Rhoades and David R. Bell, *Medical Physiology - Principles for Clinical Medicine*, 4th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins - Wolters Kluwer business, 2013.
- [17] Adolf Faller and Michael Schuenke, *The Human Body - An Introduction to Structure and Function*. New York: Thieme, 2004.
- [18] R. L. Souhami and J. Moxham, *Textbook of Medicine*, 4th ed.: Churchill Livingstone, 2004.
- [19] Eric P. Widmaier, Hershel Raff, and Kevin T. Strang, *Vander's Human Physiology: The Mechanisms of Body Function*.: McGraw - Hill, 2008, vol. 11th edition.
- [20] Themis Zelmanovitz et al., "Diabetic nephropathy," *Diabetology & Metabolic Syndrome*, pp. 1-17, 2009.
- [21] Rcmpharma. (2012, Janeiro) Rcmpharma. [Online]. <http://www.rcmpharma.com/actualidade/saude/12-01-12/doentes-e-medicos-defendem-maior-incremento-da-dialise-peritoneal>
- [22] Fernando Macário, "Relatório Gabinete de Registo da SPN - Tratamento Substitutivo Renal da Doença Crónica Estadio V em Portugal," 2013.
- [23] Romana Borja Santos, "Ministério quer apostar num tipo de hemodiálise que pode ser

- feita em casa," 2013.
- [24] Troy Hibbard and Anthony J. Killard, "Breath Ammonia Analysis: Clinical Application and Measurement," *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, pp. 21-35, 2011.
- [25] T. H. Risby and S. F. Solga, "Current status of clinical breath analysis," *Applied Physics B - Lasers and Optics*, pp. 421-426, 2006.
- [26] Elham Jazan and Hadi Mirzaei, "Direct analysis of human breath ammonia using corona discharge ion mobility spectrometry," *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, vol. 88, pp. 315-320, January 2014.
- [27] Paweł Mochalski et al., "Blood and breath profiles of volatile organic compounds in patients with end-stage renal disease," *BMC Nephrology*, vol. 15, pp. 43-57, March 2014.
- [28] Anton Amann et al., "Analysis of Exhaled Breath for Disease Detection," *Annual Review of Analytical Chemistry*, vol. 7, pp. 455-482, June 2014.
- [29] K. H. Kim, Shamin Ara Jahan, and Ehsanul Kabir, "A review of breath analysis for diagnosis of human health," *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*, vol. 33, pp. 1-12, March 2012.
- [30] Andrea Mazzatenta, Camillo Di Giulio, and Mieczysław Pokorski, "Pathologies currently identified by exhaled biomarkers," *Respiratory Physiology & Neurobiology*, vol. 187, no. 1, pp. 128-134, June 2013.
- [31] Bogusław Buszewski, Martyna Keszy, Tomasz Ligor, and Anton Amann, "Human exhaled air analytics: biomarkers of diseases," *Biomedical Chromatography*, vol. 21, no. 6, pp. 553-566, April 2007.
- [32] Wolfram Miekisch, Jochen K Schubert, and Gabriele F E Noeldge-Schomburg, "Diagnostic potential of breath analysis—focus on volatile organic compounds," *Clinica Chimica Acta*, vol. 347, no. 1-2, pp. 25-39, September 2004.
- [33] Timothy Do Chau Minh, Donald Ray Blake, and Pietro Renato Galassetti, "The clinical potential of exhaled breath analysis for diabetes mellitus," *Diabetes Research and Clinical Practice*, vol. 97, no. 2, pp. 195-205, August 2012.
- [34] Y. A. Zolotov, "Breath analysis (from the editor-in-chief)," *Journal of Analytical Chemistry*, vol. 60, p. 565, 2005.
- [35] Z. H. Endre et al., "Breath ammonia and trimethylamine allow real-time monitoring of haemodialysis efficacy," *Physiological Measurement*, vol. 32, pp. 115-130, 2011.
- [36] B Grabowska-Polanowska et al., "Detection of potential chronic kidney disease markers in breath using gas chromatography with mass-spectral detection coupled with thermal desorption method," *Journal of Chromatography A*, pp. 179-189, August 2013.
- [37] Leiliane Coelho A. Amorim and Zenilda de L. Cardeal, "Breath air analysis and its use as a biomarker in biological monitoring of occupational and environmental exposure to chemical agents," *Journal of Chromatography B*, pp. 1-9, 2007.
- [38] Jae Kwak and George Preti, "Challenges in the Investigation of Volatile Disease Biomarkers in Urine," in *Volatile Biomarkers - Non-Invasive Diagnosis in Physiology and Medicine*, 2013, pp. 395 - 404.
- [39] Wenqing Cao and Yixiang Duan, "Current Status of Methods and Techniques for Breath Analysis," *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, vol. 37, no. 1, pp. 3-13, March 2007.
- [40] C.E. Davis, M. Frank, B. Mizaikoff, and H. Oser, "Editorial - The Future of Sensors and Instrumentation for Human Breath Analysis," *Sensors Journal, IEEE*, vol. 10, no. 1, pp. 3-6, January 2010.
- [41] Shneh Sethi, Ranjan Nanda, and Trinad Chakraborty, "Clinical Application of Volatile Organic Compound Analysis for Detecting Infectious Diseases," *CMR - Clinical Microbiology Reviews*, vol. 26, pp. 462-475, July 2013.
- [42] Hitoshi Ishida et al., "The breath ammonia measurement of the hemodialysis with a QCM-NH₃ sensor," *Bio-Medical Materials and Engineering*, vol. 18, no. 2, pp. 99-106, 2008.
- [43] Nikolaos Pagonas et al., "Volatile Organic Compounds in Uremia," *PLoS ONE* 7(9): e46258, January 2012.
- [44] Troy Hibbard et al., "Point of Care Monitoring of Hemodialysis Patients with a Breath Ammonia Measurement Device Based on Printed Polyaniline Nanoparticle Sensors," *Analytical Chemistry*, vol. 85, p. 12158-12165, 2013.

- [45] Saraladevi Naicker, "Biomarkers of renal disease," *South Afr J Anaesth Anal*, 2011.
- [46] Giovanni Neri et al., "Real-time monitoring of breath ammonia during haemodialysis: use of ion mobility spectrometry (IMS) and cavity ring-down spectroscopy (CRDS) techniques," *Nephrol Dial Transplant*, pp. 2945–2952, April 2012.
- [47] Simone Meinardi, Kyu-Bok Jin, Barbara Barletta, Donald R Blake, and Nosratola D. Vaziri, "Exhaled breath and fecal volatile organic biomarkers of chronic kidney disease," *Biochimica et Biophysica Acta*, pp. 2531-2537, 2013.
- [48] Chandrasekhara B. Hariharan, "Implementation of Multi-Capillary Column-Ion Mobility Spectrometry (MCC-IMS) for Medical and Biological Applications," Dortmund, 2012.
- [49] F. Li, Z. Xie, H. Schmidt, S. Sielemann, and J.I. Baumbach, "Ion mobility spectrometer for online monitoring of trace compounds," *Spectrochimica Acta Part B*, pp. 57: 1563–1574, 2002.
- [50] Till Schneider, Anne-Christin Hauschild, Jorg Ingo Baumbach, and Jan Baumbach, "An Integrative Clinical Database and Diagnostics Platform for Biomarker Identification and Analysis in Ion Mobility Spectra of Human Exhaled Air," *Journal of Integrative Bioinformatics*, pp. 1-13, 2013.
- [51] G. A. Eiceman and Z. Karpas, *Ion Mobility Spectrometry*.: CRC Press: Taylor & Francis Group, 2005.
- [52] Ricardo Alves, "Estudo dos Biomarcadores associados a doenças renais," FCT-UNL, PhD thesis Dezembro 2012.
- [53] W. Vautz et al., "Ion Mobility Spectrometry for food quality an safety," *Food Additives and Contaminants*, pp. 1064-1073, Jun 2006.
- [54] Helena Ferreira, Caracterização de sacos Tedlar® e Flex Film de recolha de ar exalado, 2011, PhD thesis, FCT-UNL.
- [55] R. Cumeras et al., "Stability and alignment of MCC/IMS devices," *International Journal for Ion Mobility Spectrometry*, vol. 15, no. 1, pp. 41-46, March 2012.
- [56] Frank A. Settle, *Handbook of instrumental techniques for analytical chemistry*.: Prentice - Hall, Inc, 1997.
- [57] Vera Ruzsanyi et al., "Detection of human metabolites using multi-capillary columns coupled to ion mobility spectrometers," *Journal of Chromatography A*, pp. 145-151, February 2005.
- [58] Melanie Jünger, Bertram Bödeker, and Jörg Ingo Baumbach, "Peak assignment in multi-capillary column-ion mobility spectrometry using comparative studies with gas chromatography-mass spectrometry for VOC analysis," *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, vol. 396, no. 1, pp. 471-482, January 2010.
- [59] G.A.S., BreathSpec® User Manual, December 2010, Version 1.0.
- [60] V. Ruzsanyi and J. I. Baumbach, "Analysis of human breath using IMS," *International Society for Ion Mobility Spectrometry*, June 2004.
- [61] "Diagnostic potential of breath analysis—focus on volatile organic compounds," *Clinica Chimica Acta*, vol. 347, no. 1-2, pp. 25-39, September 2004.

ANEXO I – Folha de Registos



Folha de Registos

Número de registo: _____

Data: _____

Idade: _____ Sexo: F ☐ M ☐

Peso: _____ kg Altura: _____ cm

Tensão arterial: ____/____ Frequência cardíaca: ____

Tem diabetes? Sim ☐ Não ☐Tem colesterol elevado? Sim ☐ Não ☐Sofre de hipertensão arterial? Sim ☐ Não ☐Sofre de doenças coronárias/cardiovasculares? Sim ☐ Não ☐Tem antecedentes relacionados com: diabetes ☐ ; colesterol elevado ☐
hipertensão arterial ☐ ; doenças coronárias/cardiovasculares ☐É fumador? Sim ☐ Não ☐

Em caso afirmativo, há quantos anos? _____ Nº de cigarros/dia: _____

Toma medicamentos? Sim ☐ Não ☐ Quais ou para que fim? _____

Observações adicionais: _____

ANEXO II – Consentimento informado



Caparica, _ de _____ de 2014

Consentimento Informado

Solicitamos a sua colaboração no desenvolvimento do projeto de Dissertação de Mestrado denominado “Estudo dos Biomarcadores associados a doenças renais”, conduzido na Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa (FCT/UNL), e na empresa NMT – Tecnologia, Inovação e Consultoria, S.A., sob orientação da Prof^a. Dra. Valentina Vassilenko.

Com este projeto pretende-se verificar a ocorrência de possíveis alterações dos compostos orgânicos voláteis (VOCs) existentes no ar exalado de pacientes que sofram de patologias renais. Com esta finalidade, será utilizado o aparelho BreathSpec® como equipamento de recolha da amostra.

Os procedimentos de recolha utilizados são **rápidos, não-invasivos e indolores**, não sendo necessária a realização de qualquer esforço por parte do colaborador. Para a recolha da amostra, este apenas tem de soprar através de um filtro. O estudo não inclui mas visitas ao hospital do que aquelas planeadas para um doente com patologia renal, havendo

recolha de amostra uma única vez. Em nenhum momento o colaborador é colocado em risco físico ou emocional.

A sua colaboração no projeto é importante, não existindo riscos específicos nem gastos associados à sua participação neste estudo.

Não se verificam benefícios clínicos imediatos para si, no entanto, as informações resultantes deste estudo poderão ajudar a aumentar o conhecimento sobre esta doença, compreendendo melhor a sua evolução. Estas informações facilitarão o diagnóstico da doença em estágios menos avançados da mesma.

Os dados recolhidos são confidenciais e apenas serão utilizados para a realização do presente estudo.

Agradecemos desde já a sua colaboração.

A aluna, _____.

A orientadora, _____
(Valentina Vassilenko)

Eu, abaixo assinado, depois de ler e ter esclarecido todas as minhas dúvidas consinto que me sejam efectuados os procedimentos mencionados acima.

Assinado, _____

ANEXO III – Informações adicionais dos colaboradores deste estudo

Tabela 0.1 – Informações clínicas referentes aos doentes em hemodiálise.

Id	Início da Hemodiálise	Diabetes	Hipertensão	Colesterol	Hemoglobina (g/dL)	Creatinina (mg/dL)	Ureia (mg/dL)	eKt (V)	Albumina	Fósforo (mg/dL)	Potássio (mmol/L)	Sódio (mmol/L)	Cálcio (mg/dL)
H01	18/11/2009	N	S	S	11,4	8,3	91	1,4	3,1	3,1	4,6	137	8,6
H02	24/02/2011	S	S	S	11,2	4,8	119	1,6	3,5	4,4	4,3	136	8,9
H03	15/01/2014	S	N	N	12	6	109	1,7	3,3	3,2	5,4	139	8,9
H04	08/10/2012	S	S	N	10,9	10,3	170	1,57	3,9	5,3	7,5	135	9
H05	31/01/2013	N	N	N	10,4	8,4	123	1,5	4	3,8	5,8	144	7,9
H06	23/02/2010	N	N	N	10,3	9,4	131	1,59	4	3,1	5,2	140	9,4
H07	08/10/2002	N	N	N	10,6	6,6	105	1,77	3,7	3,8	5,7	141	8,6
H08	11/05/2011	N	N	N	11	12,7	176	1,29	4,3	4,6	5,6	140	8,2
H09	04/01/2010	S	S	N	9,7	7,5	132	1,5	3,9	3,9	5,8	139	8,8
H10	02/08/2013	S	S	N	11,5	5,8	140	1,37	3,6	4,1	6,8	131	9,6
H11	27/02/2014	N	S	N	11,6	4,8	139	1,54	3,6	2	5,5	134	10
H12	18/10/2011	S	N	S	12,5	6,2	46	1,79	3,7	1,7	5,2	130	10,3
H13	10/07/2012	S	S	N	11,6	6,8	123	1,78	3,6	5	5,9	134	9

Tabela 0.2 - Informações clínicas referentes aos doentes em estádios intermédios da doença renal crónica.

Id	Diabetes	Hipertensão	Colesterol	Hemoglobina (g/dL)	Creatinina (mg/dL)	Ureia (mg/dL)	eGFR-MDRD (ml/min/1,73 m ²)	Proteinúria (g/g)	Fósforo (mg/dL)	Potássio (mmol/L)	Sódio (mmol/L)	Cálcio (mg/dL)
I01	N	S	N	9,9	3,1	106	20	2,7	3,9	5	145	9,3
I02	N	S	S	11,7	2,7	104	24	0,1	2,8	4,8	142	9
I03	N	N	N	11,2	2,6	80	25	0,6	3,1	4,7	140	9,2
I04	S	N	N	10	5,8	171	10	0,2	5	4,8	143	7,8
I05	N	N	N	10,2	4,5	169	14	2,1	4,2	5,6	137	8,8
I06	N	S	S	12,4	2,2	86	31	0,2	3,5	5,2	142	9,5
I07	N	N	N	10,8	3,1	135	27	0,3	3,5	2,9	141	9,9
I08	N	S	S	11,4	1,9	113	42	0,1	3,5	4,3	142	9,7
I09	N	S	N	10,7	1,3	168	15	0,1	4,2	5,4	139	9,5
I10	S	N	N	12,3	4,1	153	48	0,3	3,2	5,2	139	9,7
I11	S	S	S	13,2	1,6	56	53	0,1	2,9	4,3	146	9,9
I12	S	S	S	9,8	1,1	108	24	2,3	3,6	5,4	143	10
I13	S	N	S	10,3	2,1	110	11	0,2	4,4	6,5	141	8,6
I14	S	S	N	12,7	4,1	116	25	0,1	4,7	5	143	8,8

ANEXO IV – Poster “Breath Analysis in Nephrology”



FCT
FACULDADE DE
CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA



BREATH ANALYSIS IN NEPHROLOGY

Valentina Vassilenko^{a,c}, Ricardo Alves^a, Joana Dias^a, Pedro Bravo^b, Cristina Outerelo^b, Aura Ramos^b

^a Centre of Physics and Technological Research (CePTec), Faculty of Sciences and Technology, NOVA University of Lisbon, Campus FCT UNL, 2829-516 Caparica, Portugal

^b Serviço de Nefrologia, Hospital Garcia de Orta, Almada, Portugal

^c NMT, S.A, Edifício Madan Parque, Rua dos Inventores, 2825-182 Caparica, Portugal

vv@fct.unl.pt

Motivation

End-stage renal disease (ESRD) prevalence has increased in the last few years, affecting over one million individuals worldwide. As for chronic renal failure (CRF), the number is 30-fold higher and, in many cases, can evolve to ESRD. Consequently, this leads to an increasing number of patients that have to resort to a kidney function substitute, like renal transplantation or dialysis. In Portugal, over 800 thousand individuals suffer from CRF in any of the five different stages, and this number ascends every year, with 2000 new cases identified. This represents a huge expenditure to the country (the national average cost of hemodialysis per patient ascended above 25.000 €).

In the present work, ion mobility spectrometry (IMS) is used to detect and analyze the exhaled breath from 31 patients on hemodialysis treatment. The main purpose of the recent study is to identify the characteristic spectrum associated with this condition, in comparison to a group of healthy subjects. The proceedings were performed in the Nephrology Service of Hospital Garcia de Orta, Portugal

Experimental



Since the '70s, investigators have studied the possible correlation between volatile organic compounds (VOCs) in the exhaled breath and the subject metabolism. Many of these VOCs have endogenous origin, and can be considered as biomarkers of certain diseases, like kidney disease, diabetes and airway infections [1].



In this work an ion mobility spectrometer (IMS) coupled to a multi-capillary column (MCC-IMS) - BreathSpec® apparatus from G.A.S. (Dortmund, Germany) - was used to collect the breath samples. The MCC-IMS analytical technique combines high sensitivity (detection limits in the low ppb, range) and fast data acquisition. The nitrogen was used as a carrier gas and samples were collected directly to the equipment, without any pre-concentration[2].

Advantages:

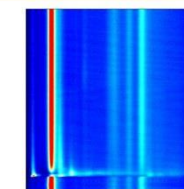
- Portability;
- Easier to move in the hospital;
- Can be driven to the patient for the analysis

The volunteers were asked to exhale through a mouthpiece equipped with a spirometer with CO₂/O₂ sensors, to guarantee that only alveolar air of the lower lung is collected. The exhaled air of 30 healthy volunteers (Control group) and 31 hemodialysis patients (Hemodialysis group) was acquired and analyzed in order to verify the differences in the spectra.

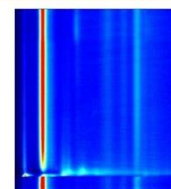
Results

From the analysis of collected data the great influence of impurities present in the ambient air at the Hemodialysis unit were observed. To avoid this a novel software developed by NMT, S.A was used in this study. This tool allow to eliminate the background influence of room air, visualize the obtained spectra in cleaner and simpler way as well as automatically point-out only the specific peaks related with the disease.

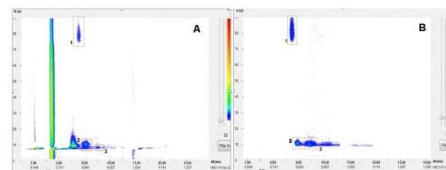
From the comparison of the spectra from Control and Hemodialysis volunteers a three different peaks were identified and classified with numbers (1-3). This results were consistent for all hemodialysis patients' spectra.



Room air spectra at hemodialysis unit



Exhaled air of hemodialysis volunteers



Typical IMS-Chromatogram obtained after the data treatment with new software: exhaled air of hemodialysis volunteers without influence of room air background (A) and with isolation of specific disease related peaks (B).

Peak	t_d (ms)	t_r (s)	I (V)	K_0 (cm ² V ⁻¹ s ⁻¹)	$1/K_0$ (cm ² Vs)
1	8,779	79,380	0,8	1,249	0,801
2	8,984	8,316	0,4	1,157	0,864
3	9,474	9,450	0,15	1,157	0,864

Conclusions and Future Work

- The characteristic spectrum associated with hemodialysis condition, in comparison to a group of healthy subjects was successfully determined.
- A characteristic fingerprint of volatile organic compounds (VOCs) in the breath induced by end-stage renal disease (ESRD) were observed.
- A novel software for automatic detection of the presence of the specific VOCs, that can be used by physicians without specific training in breath analysis techniques.
- In the future, more volunteers with this pathology in different renal failure stages should be considered.

References

- [1] Drummer, J. et al. (2011). Analysis of biogenic VOCs in human health and disease. *Trends in Analytical Chemistry*. 30: 960-967.
- [2] Vautz, W., et al. (2009). Breath analysis – performance and potential of ion mobility spectrometry. *J. Breath. Res.* 3

ANEXO V – Certificado de participação no Workshop “Medical application of IMS technology for Health”

